THESIS MUNICH 1965

ZUM NACHWEIS DER MIKROBIELL BEDINGTEN HYDROLYTISCHEN FETTSPALTUNG

HANNO SCHULZE

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153516_0049

Dissertationsdruck Franz Frank, München 23,
Werneckstraße 27, Tel. 34 36 51

Aus dem Institut für Nahrungsmittelkunde der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Vorstand: Professor Dr. L. Kotter

ZUM NACHWEIS DER MIKROBIELL BEDINGTEN HYDROLYTISCHEN FETTSPALTUNG

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der veterinär-medizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Hanno Schulze
aus
Berlin

München 1965

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. L. Kotter
Referent: Prof. Dr. L. Kotter

Tag der Promotion: 26. Februar 1965

Der Druck von 10 Farbabbildungen wurde vom Dekan erlassen.
Sie sind im Original in der Fakultätsbibliothek einzusehen.

IN DANKBARKEIT

MEINEN ELTERN

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	9
2	LITERATUR	11
2.1.	Fettabbau in Lebensmitteln	11
2.11	Allgemeines	11
2.12	Fettspaltende Mikroorganismen	12
2.13	Hydrolyse beeinflussende Faktoren	20
2.131	Wasserstoffionenkonzentration	20
2.132	Thermische Einflüsse	21
2.133	Chemische Einflüsse	21
2.134	Mechanische Einflüsse	23
2.135	Substratspezifität	23
2.2	Nachweis der hydrolytischen Fettspaltung	23
2.21	Histologischer Nachweis	23
2.211	Oxazinfarbstoffe	24
2.212	Kupferverbindungen	24
2.213	Nachweis durch Polarisation	24
2.22	Biologischer Nachweis	25
2.221	ohne Indikator	25
2.222	mit Indikator	26
2.222 1	Kupferverbindungen	26
2.222 2	Lackmus, Spiritblue	26
2.222 3	Methylenblau	26
2.222 4	Chinablau	26
2.222 5	Nilblausulfat	27
2.222 6	Viktoriablau	28
2.23	Chemischer Nachweis der Hydrolyse	28
2.231	Allgemeines	28
2.232	Säulenchromatographie	30
2.233	Papierchromatographie	31
2.234	Dünnschichtchromatographie	32
2.235	Gaschromatographie	33

3	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	36
3.1	Histologische Untersuchungen	36
3.11	Nilblausulfatfärbung	36
3.12	Betrachtung im polarisierten Licht bei Sudanfärbung	36
3.2	Biologische Untersuchungen	37
3.21	Tributyrin-Agar	37
3.22	Schweineschmalz-Agar ohne Indikator	38
3.23	Chinablau-Agar	38
3.24	Nilblausulfat	39
3.241	Nilblausulfat-Agar	39
3.242	Nilblausulfat-Streifentest	40
3.243	Nilblausulfat-Ringprobe	40
3.25	Viktoriablau	40
3.251	Viktoriablau-Ringagar	40
3.252	Viktoriablau-Schrägagar	42
3.252 1	mit Schweinefettzusatz	42
3.252 2	mit anderen Triglyceridzusätzen	52
3.26	Untersuchung zur Abhängigkeit der Fettspaltung von der Wasserstoffionenkonzentration	52
3.27	Untersuchung zur Sauerstoffabhängigkeit der Fettspaltung	54
3.28	Untersuchung zur Abhängigkeit der Fettspaltung vom Kochsalzgehalt des Substrats	56
3.29	Untersuchung zum Einfluß von Tween 80 auf das Wachstum der Mikroorganismen	58
3.3	Chemische Untersuchungen	58
3.31	Isolierung freier Fettsäuren	58
3.311	aus Schweinefett nach Einwirkung von Reinkulturen	58
3.312	aus Rohwurstfett unter Berücksichtigung von Reifung und Lagerung der Würste	59
3.32	Trennung der Fettsäuren	61
3.321	Papierchromatographische Trennung	61

3.322 Dünnschichtchromatographische Trennung 62
3.322 1 Trennung auf nicht imprägnierten Platten 62
3.322 2 Trennung auf mit Undekan imprägnierten Platten 63
3.323 Gaschromatographische Trennung 67
3.323 1 Methylveresterung 67
3.323 2 Trennung 67
3.324 Infrarotspektrophotometrie 75

4 DISKUSSION 77

4.1 Lokalisation der Fettspaltung in Lebensmitteln mit histologischen Methoden 77

4.2 Nachweis der lipolytischen Aktivität mit biologischen Methoden 78

4.21 Vergleich der Methoden 78
4.211 ohne Indikator 78
4.212 mit Indikator 79
4.212 1 Nilblausulfat 79
4.212 2 Viktoriablau 80
4.22 Bedeutung direkter und indirekter Nachweise 81

4.3 Substratspezifität lipolytischer Mikroorganismen 83

4.31 Allgemeines (unter Berücksichtigung biologischer Nachweismethoden) 83
4.32 Chemische Untersuchungen 84
4.321 Säurezahl 84
4.322 Chromatographische Trennung 85
4.322 1 Papierchromatographie 85
4.322 2 Dünnschichtchromatographie 85
4.322 3 Gaschromatographie 86
4.323 Weitere Untersuchungen 87
4.33 Bedeutung biologischer und chemischer Methoden für den Nachweis der Substratspezifität 87

4.4	Milieuabhängigkeit der Nachweise	89
4.41	Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration	89
4.42	Sauerstoffabhängigkeit der Fettspaltung	90
4.43	Chemische Einflüsse	90
4.431	Einfluß von Kochsalz	91
4.432	Einfluß von Indikatoren und Emulgatoren	91
4.433	Einfluß des weiteren Abbaus der Fettsäuren auf die Nachweise	91
4.5	Relativer Wert der Nachweise	92
5	ZUSAMMENFASSUNG	94
6	LITERATURVERZEICHNIS	95

1 EINLEITUNG

In fetthaltigen Lebensmitteln tierischer Herkunft spielt der mikrobielle Fettabbau eine entscheidende Rolle für die Vorratshaltung und - bei einigen von ihnen - für die Reifung. Dabei nimmt die hydrolytische Fettspaltung eine zentrale Stellung ein.

Die bisher zum Nachweis der Lipolyse gebräuchlichen Methoden kamen im allgemeinen isoliert oder wenigstens unter Bevorzugung einer bestimmten Arbeitsrichtung zur Anwendung. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte ich einschlägige histologische, biologische und chemische Nachweisverfahren als Basis für zukünftige Untersuchungen des mikrobiellen Fettabbaus vergleichen.

2 LITERATUR

2.1 Fettabbau in Lebensmitteln

2.11 Allgemeines

Lebensmittel haben weder eine einheitliche noch eine konstante Zusammensetzung. Ihre Hauptkomponenten sind Eiweiß, Fett und Kohlenhydrate (wobei die Kohlenhydrate bei Lebensmitteln tierischer Herkunft eine untergeordnete Rolle spielen). Die einzelnen Lebensmittelbestandteile sind den verschiedensten Um- und Abbauvorgängen unterworfen. Wesentliche Umsetzungen betreffen den Fettabbau.

Der biochemische Fettabbau beruht auf der Wirkung lipolytischer Fermente, die einerseits in den Lebensmitteln bzw. ihren Bestandteilen originär vorkommen und zum anderen bakterieller Herkunft sind.

Originäre Lipasen wurden vor allem in Milch nachgewiesen (253, 231, 104, 166, 238, 289, 128, 67, 212). Darüber hinaus konnten auch in anderen Lebensmitteln tierischer Herkunft lipolytische Fermente gefunden werden, so z.B. im Muskelfleisch (169), im Fettgewebe von Warmblütern (332), praktisch in allen Geweben einschließlich der Organe (175).

Neben den originären spielen bakterielle Lipasen eine erhebliche Rolle beim Fettabbau. Beide Fermentgruppen, die sich in ihrer biochemischen Aktivität nicht wesentlich unterscheiden, bewirken eine hydrolytische Spaltung der Fette. So haben HILDITCH (103) sowie HOROWITZ-WLASSOWA und LIVSCHITZ (109) lipolytische Mikroorganismen für die anfängliche Hydrolyse mit verantwortlich gemacht. Die dabei entstehenden freien Fettsäuren sind der fermentativen Oxydation wie auch der Autoxydation in verstärktem Maße ausgesetzt. Für diesen Prozeß kommen Lipoxydasen und Fettsäuredehydrasen in Frage. FRANKE, PLATZEK und EICHHORN (69) haben Untersuchungen über den weiteren Abbau der Fettsäuren durchgeführt, ebenso LEHMANN und UHLENHUTH (174) mit einem instruktiven Überblick über die Möglichkeiten der spontanen Zersetzung von Fettsäuren.

Der autoxydative Fettabbau ist im wesentlichen auf die Anfälligkeit der im Fett enthaltenen bzw. bei seinem Abbau entstehenden freien Fettsäuren zurückzuführen, vor allem der ungesättigten gegen Luftsauerstoff. Charakteristisch ist bei diesen Prozessen das Auftreten von Aldehyden, Ketonen, Carbonsäuren und Polymerisationsprodukten. Eine ausführliche Darstellung dieser Vorgänge geben LUNDBERG (184) und MUNDINGER (211).

MUKHERJEE (209) hat dargelegt, daß der Fettabbau in verschiedenen Phasen abläuft und der Luftsauerstoff dabei oxydierend wirkt. Seinen Beobachtungen zufolge kommt es nach anfänglicher hydrolytischer Spaltung der Glyceride in Glycerin und freie Fettsäuren durch Lipasen unter Mitwirkung verschiedener oxydativer Enzyme zur Oxydation niederer gesättigter Fettsäuren durch Fettsäureoxydasen und der ungesättigten Fettsäuren durch Lipoxydasen. Andere Autoren (131, 73, 68, 105, 232) äußern sich in ähnlicher Weise.

Die gesättigten Fettsäuren werden im übrigen durch Dehydrogenasen in die ungesättigte Form übergeführt, in der sie auf autoxydativem oder enzymatischem Wege oxydiert werden. Der Peroxydabbau erfolgt sekundär, und die Lipoxydasen werden zerstört. Diese Vorgänge werden als teils parallel, teils nacheinander ablaufend beschrieben, so daß sie sich nicht in eine systematische Fettabbaukette eingliedern lassen.

2.12 Fettspaltende Mikroorganismen

Während die Untersuchungen über fettspaltende Mikroorganismen besonders bei Milch- und Milchprodukten schon sehr früh und ausgiebig durchgeführt wurden, datieren sie bei einem anderen Teil der Lebensmittel tierischer Herkunft - z.B. den fetthaltigen Fleischerzeugnissen - in verstärktem Maße erst aus neuerer Zeit. Daneben liegen schon seit langem Hinweise auf die allgemeine hydrolytische Fettspaltung durch Mikroorganismen vor, deren Aussagewert im Rahmen dieser Untersuchung vergleichend berücksichtigt werden soll.+)

Bereits um die Jahrhundertwende begannen die Untersuchungen über die lipolytische Aktivität von Mikroorganismen. SOMMARUGA (283) führte Untersuchungen mit einfachen Nährböden und verschiedenen Fetten durch. Als fettspaltend wies EIJKMAN (59) B. pyocyaneus, Staph. pyogenes aureus, B. prodigiosum, B. fluorescens, B. indicus und B. ruber nach, während Bac. anthracis, B. coli

+) Terminologie weitgehend nach den zit. Autoren

communis, B. typhi, B. diphteriae u.a. von ihm als lipolytisch negativ bezeichnet wurden.

SCHREIBER (271) stellte heraus, daß reines Fett für sich kein geeigneter Nährboden für Mikroorganismen ist; erst in feiner Verteilung mit anderen Stoffen (d.h. emulgiert) würde es eine hinreichend große Angriffsfläche für bakterielle Fermente bieten. Gleichzeitig seien die Umweltsbedingungen, insbesondere der Sauerstoffgehalt von Bedeutung.

SPIEKERMANN und BREMER (286) untersuchten hauptsächlich die Fettzersetzung durch Schimmelpilze und Hefen. De KRUYFF (167) schlug in seiner Veröffentlichung über hydrolytisch fettspaltende Aerobier vor, fettspaltende Mikroorganismen als "Lipobakteria" zu bezeichnen. Fettspaltende Eigenschaften bei Cholera- und Staphylokokken-Haemolysinen wiesen NEUBERG und REICHER (220) nach. HERTER (102) konnte bei B. aerogenes capsulatus, B. coli und B. putrificus unterschiedlich starke Lipolyse feststellen. Als fettspaltendes Bakterium bezeichnete HUSS (114) ein "Bacteridum lipolyticum n.sp.".

OHTA (228) wies über die Verminderung des Fettgehaltes eines in Wasser suspendierten Leberpulvers folgende Schimmelpilze als Fettspalter nach: Cladosporidium herbarum, Penicillium glaucum, Aspergillus glaucus, Aspergillus nidulans und Actinomucor repens.

Die Untersuchungen von EIJKMAN (59) wurden von SÖHNGEN (281, 282) bestätigt. Er beschrieb als lipolytisch mit unterschiedlichem Wirkungsgrad: Bact. punctatum, Pseudomonas pyocyaneus, Bacillus liquefaciens, Bacterium lipolyticum, Bacillus stutzeri, Pseudomonas fluorescens, Oidium lactis, Aspergillus niger, Penicillium glaucum und Cladosporidium butyri.

SPIEKERMANN (285) stellte fettspaltende Eigenschaften bei höheren Pilzen fest. SCHNELL (267) fand lipolytische Aktivität bei Oospora lactis. Olivenöl, Triacetin und Äthylbutyrat hydrolysierten nach WELLS und CORPER (326) in abnehmender Reihenfolge Staphylokokken, Pseudomonas pyocyaneus, Bact. coli, Bact. dysenteriae und Mycobacterium tuberculosis. In verschiedenen aus Milch isolierten Bakterienarten - u.a. Bacterium proteus und Bacillus mesentericus - wiesen KENDALL, DAY und WALKER (156) Lipasen nach, ebenso AVERY und CULLEN (15) bei ihren Untersuchungen über die Enzyme von Pneumococcus und SCHENKER (266) in Aspergillus niger.

STEVENS, FRANKLIN und WEST (295) fanden Fettspalter unter haemolytischen Streptokokken. MICHAELIS und NAKAHARA (205) beschrieben fettspaltende Eigenschaften bei Bacterium prodigiosum, höheren Hefen, Mycobact. tuberculosis, Staph. aureus und albus, Corynebacterium diphteriae, bei Keimen der dysenterischen und coliformen Gruppe, bei Bacterium typhosum und paratyphosum.

Bei der Untersuchung des mikrobiellen Fettabbaus in Butter kamen RAHN und MOHR (249) zu dem Ergebnis, daß aerobe Fettspalter die Hauptrolle spielten, die den notwendigen Sauerstoff der in der Butter enthaltenen Luft entnehmen können.

BROWN (29) fand Fettspalter unter anaeroben Sporenbildnern. FIERZ-DAVID (64) konnte entsprechende Eigenschaften bei Penic. glaucum sowie Aspergillus niger und VOSS (319) bei Kahmhefen feststellen. DERX (56) hat bei Penicillium-Arten die Fähigkeit, Fette zu spalten, beobachtet; v. MALLINCKRODT-HAUPT (191) arbeitete über die lipolytischen Fähigkeiten von Hautpilzen, wobei er feststellte, daß Trichophytiepilze Neutralfette und andere Glycerinester spalten und ihre Abbauprodukte assimilieren können, und zwar solche mit niedrigerem Schmelzpunkt besser als die mit einem höheren. VAN DER WALLE (323) berichtete über Lipolyse durch Pseudomonas pyocyaneus, Staphylokokken sowie Stämme der coliformen und dysenterischen Gruppe.

HAAG (80) fand bei seinen umfassenden Untersuchungen über die mikrobielle Lipolyse unter besonderer Berücksichtigung des weiteren Abbaues von Fettsäuren folgende Fettspalter: stark lipolytisch: Bact. fluorescens liquefaciens, Mycobact. phlei, Mycobact. lacticola, Oospora lactis, Torula, Penicillium, Aspergillus, Mucor; in geringerem Maße: Microc. albus, Streptoc. lactis, Plocamobacterium spec., Bact. acidi lactici, Bact. coli und Bac. subtilis. PIGULEWSKI und CHARIK (242) konnten fettspaltende Eigenschaften bei nicht weiter differenzierten Stäbchen und Purpurbakterien nachweisen.

Bei der Untersuchung des mikrobiellen Fettabbaus in Butter, die mehrere Tage nach der Herstellung umgearbeitet worden war, wies GRATZ (79) in den Randschichten einen höheren Grad an mikrobieller Fettspaltung nach als im Zentrum. Als stark fettspaltend fand er Oidium lactis und in geringerem Maße Hefen, was er auf eine starke Vermehrungsfähigkeit dieser Aerobier insbesondere in den Randschichten zurückführte.

LOEWENSTEIN, FLEMING und NEILL (181) untersuchten die Aktivität mikrobieller Lipasen, wobei sie als Kriterium die Aziditätszunahme in einem Gemisch von Lipasen, Tributyrin und Phosphatpuffer wählten. Fettspaltende Eigenschaften fand HÜTTIG (113) bei Bact. fluorescens und MACY (186) bei Alternaria-, Aspergillus-, Hormodendrum-, Mucor-, Penicillium- und Oospora-Arten.

Bei Milieuuntersuchungen stellte PLOTKINA (243) fest, daß Oidium lactis in einem glukosehaltigen Medium, mit Ammoniumsalzen und Pepton als N-Quelle sowie 2-3% Olivenöl bei 21 - 26°C und einem pH-Wert von 5,0 optimale Lipasewirkung zeigte, während B. pyocyaneus bei 22 - 24°C und leicht saurer bis neutraler Reaktion, unter sonst gleichen Bedingungen, große lipolytische Aktivität entwickelte.

WAKSMAN (321) maß neben den Pilzen einer Anzahl von Aerobiern wie Staph. aureus, Bacterium prodigiosum, Bacterium pyocyaneum, Bacterium fluorescens und Bacterium lipolyticum für die Fettspaltung besondere Bedeutung bei.

HENNEBERG (96) konnte bei Mikrokokken, verschiedenen Streptokokken, Bact. fluorescens, Bact. vulgare und Bact. cloacae fettspaltende Eigenschaften feststellen; außerordentlich starke Fettspaltung fand er (97) darüber hinaus bei den Gattungen Oospora, Fusarium, Verticillium, Phoma, Hyalopus und Penicillium, Milchsäurebakterien, Torula und Sporenbildnern sowie (98) bei Mikrokokken und einem Corynebacterium; zusammen mit KNIEFALL (100) stellte er im besonderen auch noch für Penicillium brevicaule entsprechende Eigenschaften fest.

Für den leicht bitteren Geschmack von Rahm bei mehrtägiger Kühlraumlagerung machten ANDERSON und HARDENBERGH (6) ein Gram-negatives Stäbchen verantwortlich, das in gewisser Beziehung nach seinem Verhalten auf gewöhnlichen Nährböden an die Vertreter der Achromobakter- und Alcaligenesgruppe erinnerte und als einzige bemerkenswerte Eigenschaft die Fetthydrolyse aufwies. TAMMISTO (301, 302) stellte nach Vorversuchen mit B. pyocyaneus, coli, lactis, lactis viscosus, Bac. subtilis, mycoides, mesentericus, Asterosporus, Micrococcus B. coronatus, B. Freudenreichii, Micrococcus aurantiacus, rosettaceus, candicans und Sarcina flava aus Kulturen von Bact. fluorescens liquefaciens und B. prodigiosus reine Lipase dar.

Bei Untersuchungen unterschieden JENSEN und GRETTIE (128) zwei Hauptklassen von Enzymen, die nach ihrer Auffassung für den Fettabbau und damit auch für die Ranzigkeit verantwortlich sind: Lipasen und Oxydasen. BERRY (20) konnte

Staph. aureus und albus, Sarcina lutea, Pseudomonas fluorescens und Penicillium expansum als Fettspalter qualifizieren. McGRATH und ANDERSON (197) führten die Untersuchungen von ANDERSON und HARDENBERGH (6) über den mikrobiellen Fettabbau in kühlraumgelagertem Rahm fort und glaubten im wesentlichen Keime der Achromobacter- und Alcaligenesgruppe dafür verantwortlich machen zu müssen.

Eine Agarplattenmethode zur Erfassung und Zählung lipolytischer Mikroorganismen gab ANDERSON (4) an und prüfte ihre Brauchbarkeit bei der Untersuchung von Milch, Rahm, Schwenkwasser von Molkereigeräten und Trinkwasser. Weitere Untersuchungen über die Methode des Fettspalternachweises führten COLLINS und HAMMER (46) durch; sie fanden in verschiedenen Milchprodukten (88) lipolytische Bakterien.

SEDYCH (273) fand fettspaltende Eigenschaften bei folgenden Mikroorganismen: Sarcina spec., Bact. fluorescens liquefaciens, Bact. coli, Bact. prodigiosum, Bact. vulgare, Bact. punktatum, Bac. subtilis, Bac. mesentericus, hefeähnlichen Mikroorganismen sowie Oospora lactis. HOROWITZ-WLASSOWA und LIVSCHITZ (109) beschrieben als einfache Fettspalter: Microc. cremoides, Microc. lipolyticus, Sarcina lutea, Bact. pyocyaneum, Bact. fluorescens liquefaciens, Bact. prodigiosum, Bact. cloacae, Bact. viscosum sacchari, Bact. butyri II, Penicillium, Aspergillus; schwächere Fettspalter: die Bac. subtilis-Gruppe; neben einfacher zeigten auch oxydative Fettspaltung: Bact. lactis aerogenes, Bact. viscosum sacchari und Bact. butyri I.

Bei der Untersuchung lipolytischer Enzyme von Achromobacter lipolyticum, Pseudomonas mucidolens und Ps. fluorescens stellten SPITZER und FARFITT (287) im sauren Bereich (p_H 7,5 - 5,5) eine höhere Aktivität fest als im alkalischen. KIRSH (159) beschrieb Aspergillus flavus und Penicillium oxalicum als starke und einige Bakterien, Actinomyceten, Mucor-, Penicillium-, Trichoderma- und Monilia-Arten als weniger starke Fettspalter; MANUS und THURSTON (195) stellten bei Mikrokokken fettspaltende Eigenschaften fest. STORCK (298) fand folgende Fettspalter: alkalisierende Streptokokken, Bact. alcaligenes, Bact. fluorescens, Bact. vulgare, Bact. lactis viscosum, Bact. vulgatus, Coryne- sowie Mycobacterien und TÄUFEL, THALER und LÖWENECK (300) Penic. glaucum und Aspergillus niger.

Auf die Bedeutung der bakteriellen Reinfektion nach erfolgter Pasteurisierung von Milch bzw. Rahm wiesen STARK und SCHEIB (292) hin. Sie fanden in der

Hauptsache Gram-negative Stäbchen, Gram-negative Mikrokokken, Gram-positive Sarcinen und nicht sporenbildende Stäbchen als fettspaltende Mikroorganismen.
Als weitere Fettspalter beschrieben VICKERY (314) Pseudomonas- und Achromobacterstämme sowie asporogene Hefen, ANDERSON (5) Bacterium lipidis, GEFFERS (71) Oospora-Arten, JENSEN und GRETTIE (129) farbstoffbildende Mikrokokken, Stäbchen, Saccharomyces-, Torula- und Schimmelpilz-Arten sowie MACY und GIBSON (187) Oospora lactis.

Die Untersuchungen von COLLINS und HAMMER (46) über Methoden zum Nachweis von Fettspaltern setzten LONG und HAMMER (182) fort. Daneben arbeiteten auch MOIR und RUSSEL (206) an der Methodik des Fettspalternachweises.

Beziehungen zwischen mikrobieller Fettspaltung und Käsereifung zeigten LANE und HAMMER (171) auf, wobei sie besonders darauf hinwiesen, daß Käse aus roher Milch zwar eine gewisse Ranzigkeit während der Frühreife zeigte, die im Verlauf der Reifung verlorenging, aber letztlich doch ein besseres Aroma aufwies als Käse aus pasteurisierter Milch.

Untersuchungen über die Lipolyse bei der Käsereifung führten PETERSON, JOHNSON und PRICE (239) durch, wobei sie zwischen Milch- und Käselipase differenzierten, da sie Unterschiede zwischen beiden Fermenten hinsichtlich ihres p_H-Optimums und der Hydrolyse von Tributyrin festgestellt hatten. Während sie der originären Milchlipase für die Käsereifung keine Bedeutung beimaßen, machten sie bakterielle Lipasen, die erst nach einer gewissen Reifungszeit auftraten, für die Geschmacksentwicklung im Käse verantwortlich.

PETERS und NELSON (235, 234) untersuchten die lipolytische Aktivität von Mycotorula lipolytica, während PETERSON und JOHNSON (237) die Hydrolyse von Butterfett durch bestimmte aus Käse isolierte Laktobazillen und Mikrokokken prüften. HOOD, GIBSON und BOWEN (106) beimpften Käse mit fettspaltenden Bakterien und stellten nach 14 - 21 Tagen schlechteren Geschmack sowie höhere Säurezahlen als bei unbeimpftem Käse fest, wobei die Veränderungen der zugesetzten Bakterienmenge proportional waren.

Lipase- (und Amylase-) Produktion fand GOODMAN (75) bei drei Pilzarten. GOLDMAN und RAYMAN (74) konnten große Unterschiede in der lipolytischen Wirksamkeit bei verschiedenen Stämmen von Pseudomonas feststellen: Ps. fluorescens, Ps. oleovorans und 2 Stämme von Ps. fragi waren stark lipolytisch, an-

dere Stämme von Ps. fragi und nicht näher identifizierter Ps. bewirkten geringere, Ps. jaegeri schwache und Ps. ovalis keine Hydrolyse. Bei ihren Arbeiten über die Einflüsse des Nährbodens auf die lipolytische Aktivität von Mikroorganismen fanden CUTCHINS, DOETSCH und PELCZAR(52) fettspaltende Eigenschaften bei Pseudomonas fluorescens, Bacteroides viscosus und Ps. aeruginosa.

Ein fast quantitatives Verfahren zur Gewinnung extrazellulärer Lipasen von Pseudomonas fragi und eine vermutlich auftretende Substratbevorzugung beschrieben NASHIF und NELSON (213), außerdem fanden sie unter bestimmten Umweltbedingungen bei einigen Gram-negativen Bakterien in Milchprodukten eine lipolytische Aktivität (216). KAUFMANN (155) stellte lipolytische Aktivität bei Bacillus mesentericus und B. vulgatus fest. KOHNLE (164) konnte bei Untersuchungen über aromabildende Rohwurstkeime insbesondere Stämme der Gattungen Achromobacter und Escherichia als Fettspalter nachweisen.

Untersuchungen über Tributyrinhydrolyse führten LEMBKE, BEUERMANN und KAUFMANN (174a) mit folgenden Bakterienstämmen durch: Bact. fluorescens, Bact. linens, Staph. aureus, B. subtilis, B. mesentericus, B. vulgatus, Bact. zopfii und Microc. flavus. Mit Ausnahme von Microc. flavus war bei allen übrigen eine positive Reaktion gegeben.

Bei einer Prüfung von 6 aus Rohwürsten isolierten Hefearten fanden LERCHE und LAMMERS (177) lipolytische Eigenschaften bei Candida lipolytica.

Bei Untersuchungen über die Hitzeresistenz von Lipasen stellte STADHOUDERS (288) fest, daß bei der Milchpasteurisierung die Milchlipase zerstört wurde und die Lipaseaktivität bereits bei der Kurzzeiterhitzung auf 55°C zurückging. Nach diesen Aussagen sollen Bakterienlipasen resistenter und folglich auch im Käse vorhanden sein. Als lipasebildende Bakterien wurden Pseudomonas, Achromobacter, Serratia- und Alcaligenesarten gefunden. Zusammenhänge zwischen Anzahl der Keime und Lipaseaktivität wurden nicht nachgewiesen.

Aus 86 Bakterienstämmen der Genera Pseudomonas, Serratia, Vibrio, Bacillus und Micrococcus isolierte KLINGE (161) 77 Stämme, die Eigelbfett und 74, die Olivenöl hydrolysierten. RITZERFELD und SCHULZ (256) wiesen fettspaltende Eigenschaften bei einigen Boden- und Abwasserkeimen aus einem Modellrieselfeld nach.

Die von ZANZUCCHI und DELINDATI (334) aus Rohwürsten isolierten lipolytischen Bakterien gehörten zu den Gattungen Escherichia, Achromobacter, Aerobacter und Pseudomonas; NIINIVAARA und POHJA (223) isolierten Gram-negative Lipolyten. Der letztgenannte Autor gibt weiterhin (245) an, daß 25% der von ihm in Rohwürsten gefundenen Mikrokokken lipolytische Aktivität aufwiesen.

Bei Untersuchungen über Lipasen bei Leptospiren stellten BERTOK und KEMENES (21) bei verschiedenen Stämmen unterschiedliche Tributyrinasebildung fest. ANDREJEW, GERNEZ - RIEUX und TACQUET (7) teilten die Mycobakterien entsprechend ihrer lipolytischen Aktivität in zwei Hauptgruppen ein, von denen eine Gruppe eine starke, die andere eine verschwindend geringe Hydrolyse hervorrufen soll; danach sind stark lipolytisch alle photochromogenen atypischen Mycobakterien, zur praktisch inaktiven Gruppe rechnen sie die typischen Tbc-Bakterien (virulente und avirulente bovine, humane und aviäre Typen), während die nicht photochromogenen atypischen Mycobakterien mit ihrer schwachen Aktivität dazwischen stehen.

Nach WILLIS (329) erzeugen Cl. botulinum, Cl. sporogenes und Cl. oedematiens Typ A auf Eigelb-Agar Opaleszenz und einen durch Lipolyse bedingten perlartigen Belag, der sich mit Kupfersulfat grünblau färbt und somit auf freie Fettsäuren hinweist.

HOBSON und MANN (105) isolierten aus dem Pansen des Schafes eine Leinöl und Tributyrin spaltende und außerdem Glycerin vergärende Gruppe streng-anaerober, Gram-negativer gebogener Stäbchen als wichtigste lipolytische Mikroorganismen in der normalen Pansenflora. Unter den Leptospiren verschiedener Serotypen sind nach KMETY und BAKOSS (163) eine größere Anzahl Lipase bildender Stämme (vorzugsweise aus der Gruppe L. australis, L. canicola, L. pomona, L. icterohaemorrhagica). Bei Untersuchungen über die Aufbewahrung lipoytischer Bakterien konnten SELIBER und DOBROWOLSKAJA (276) die lipolytische Eigenschaft in Subkulturen von Bact. galleriae sowie Bact. butyri I und II lange Zeit erhalten. PERNICE (232) untersuchte 51 Staphylokokkenstämme unter Verwendung von Eserin, als Inhibitor, und Taurocholat, als Aktivator der Lipase, auf ihre lipolytische Aktivität.

Die Untersuchungen von RATH (250) zielten im wesentlichen darauf ab, Untersuchungsmethoden zur Ermittlung der Lipolyse zu entwickeln, bei denen das Bakterienwachstum durch Indikatoren nicht beeinflußt wird.

CHANDAN, CARRENCEDO und SHAHANI (42) untersuchten die Lipase verschiedener Schimmelpilze wie Geotricum candidum, Aspergillus niger und Penicillium roqueforti und von Achromobacter lipolyticum auf ihr Verhalten gegenüber Antibiotika. Dabei stellten sie keine Spezifität der Antibiotika bezüglich der Hemmung extra- und intrazellulärer Lipasen fest.

Zur Klassifizierung von Mikrokokken und Staphylokokken zog BAIRD-PARKER (15 a) die Fähigkeit der Mikroorganismen, Eigelbfett zu spalten mit heran.

Im Rahmen einer Untersuchung über die Beteiligung von Mikroorganismen am Fettabbau in Rohwürsten unter besonderer Berücksichtigung der Aromabildung isolierte WELLHÄUSER (325) gemeinsam mit TERPLAN (304) aus 50 Rohwurstkeimen 34 unterschiedlich stark lipolytisch wirkende Keime der Gattungen Micrococcus, Achromobacter, Brevibacterium, Flavobacterium und Streptococcus. Im Rahmen umfangreicher Untersuchungen über biochemische Fähigkeiten von Rohwurstkeimen gingen NIINIVAARA, POHJA und KOMULAINEN (224) auch auf deren Lipolysevermögen ein und stellten Zusammenhänge mit der Aromabildung fest. CORETTI (48) konnte bei Laktobazillen, die aus Rohwürsten stammten, fettspaltende Eigenschaften feststellen, insbesondere bei Lactobacillus brevis und in geringerem Umfang bei Lactobacillus fermenti.

2.13 Hydrolyse beeinflussende Faktoren

Eine Aussage über die hydrolytische Wirkung eines Mikroorganismus setzt voraus, daß seine tatsächliche Aktivität nachweisbar ist. Im Idealfall besteht zwischen nachweisbarer Lipase und Reaktionszeit eine nahezu lineare Funktion (33). Diese Idealfunktion wird dann gestört, wenn verschiedene Vorgänge mechanischer, physikalischer und chemischer Natur die Lipasebildung und die anschließende hydrolytische Fettspaltung beeinflussen (158, 237).

2.131 Wasserstoffionenkonzentration

Beziehungen zwischen mikrobieller Lipaseproduktion bzw. Lipaseaktivität und der Wasserstoffionenkonzentration des Milieus wurden verschiedentlich aufgezeigt:

So stellte PLOTKINA (243) für Oidium lactis ein p_H-Optimum von 5,0 und für B. pyoceaneus von neutral bis leicht sauer fest. SPITZER und PARFITT (287) fanden bei der Untersuchung bakterieller Lipasen, daß die Enzyme von A. lipolyticum, Ps. mucidolens und Ps. fluorescens im alkalischen Bereich weniger aktiv sind als im sauren (p_H 5,0 - 8,0 (Maximum bei p_H 6,0)). Bei p_H 4,0 wiesen sie eine Inaktivierung der Lipase und bei p_H 3,0 ihre Zerstörung nach. Nach NASHIF und NELSON (215) zeigte Pseudomonas fragi in Sahne bei 4,9 - 8,2 lipolytische Tätigkeit, die im p_H-Bereich von 5,7 - 6,6 optimal war. ALFORD und ELLIOT (2) stellten bei Untersuchungen an Pseudomonas fluorescens eine maximale Lipasenentwicklung bei p_H 7,0 fest.

2.132 Thermische Einflüsse

Unbeschadet der allgemeinen Bedeutung der Temperatur für chemische Reaktionen liegt ihre besondere Bedeutung auf dem Gebiet biochemischer Reaktionsabläufe, wie sie Fermentreaktionen darstellen.

Bei einem haemolytischen Streptococcus konnten STEVENS, FRANKLIN und WEST (295) die Lipaseaktivität durch Erhitzen auf 55°C über 10 Minuten zerstören. PLOTKINA (243) wies für Oidium lactis bei 21 - 26°C, für B. pyocyaneus bei 22 - 24°C optimale Lipolyse nach. Die Hitzeempfindlichkeit von Bakterienlipase wiesen auch LOEWENSTEIN, FLEMING und NEILL (181) nach. TAMMISTO (301) (302) sowie GOLDMAN und RAYMAN (74) sahen eine Temperaturzunahme als herabsetzenden Effekt für die Lipaseproduktion der Bakterien aus der Gattung Pseudomonas an. Als günstige Temperaturen werden im allgemeinen Bereiche zwischen 20 u. 37°C angegeben (218, 55).

2.133 Chemische Einflüsse

Die chemische Zusammensetzung des Substrates ist für die Lipaseproduktion und -aktivität von Bedeutung (52). So laßt die Anwesenheit bestimmter Kohlenwasserstoffe und organischer Säuren nach PETERS und NELSON (236) die Lipaseproduktion von Geotrichum candidum abnehmen. (Bei Zuchtung der Keime unter Verwendung von Glucose und Olivenöl als Energiequelle ergibt sich keine oder nur geringe Lipaseaktivität.) SÖHNGEN (282) untersuchte die Aktivität verschie-

dener Lipasen in Anwesenheit von Säuren und gab an, zwei sich hierin unterscheidende Typen von Bakterienlipasen gefunden zu haben. Eine irreversible Schädigung der Lipase von Geotrichum candidum unter Sauerstoffeinfluß konnte NELSON (218) nachweisen, ebenso eine Enzymhemmung durch $HgCl_2$, die jedoch durch Glutathion und andere Reduktionsmittel teilweise aufgehoben werden konnte. Während durch übermäßige Sauerstoffzufuhr Herabsetzungen oder Schädigungen der lipolytischen Aktivität herbeigeführt werden konnten, wurde auf der anderen Seite von SCHREIBER (271), RAHN und MOHR (249), GRATZ (79) u.a. die Notwendigkeit von Sauerstoff für die aerobe Fettspaltung herausgestellt.

KLINGE (161) betrachtete Pepton und Tween 80 als Fettspaltungsinhibitoren mit unterschiedlicher Wirkung. Eine Hemmung der Lipase in Kulturfiltraten durch Formalin wiesen PERNICE und MACRI (233) nach. Untersuchungen von FODOR und CHARI (66) zufolge werden Lipasen von Penicillium roqueforti und Aspergillus niger durch Taurocholat in Konzentrationen von 0,18% gehemmt. Dagegen konnte PERNICE (232) durch Taurocholat die Lipase bei Staphylokokken aktivieren, während er bei Eserin eine inhibierende Wirkung feststellte.

Nach KUSHNER (168) wird durch niedermolekulare Alkohole das Lipasebildungsvermögen bei Mikroorganismen gehemmt. Äthanol und Propanol sollen dabei in ihrer Wirkung Methanol und Buthanol übertreffen, wobei nur die Lipasebildung eine Hemmung erfährt, während bereits vorhandenes Enzym unbeeinflußt bleibt.

Eine Zunahme der Lipaseproduktion konnten NASHIF und NELSON (214) bei Ps. fragi feststellen, wenn sie zu vitaminfreien Nährmedien z.B. geringe Mengen von Capryl- oder Caprinsäure zusetzten. Demgegenüber wiesen LAXA (172), STOCKOE (297), HAAG (80), TÄUFEL, THALER und LOEWENECK (300) sowie SPIEKERMANN (285) nach, daß niedermolekulare Fettsäuren eine wachstumshemmende Wirkung haben. Nach diesen Angaben soll die Hemmwirkung der Fettsäuren mit steigendem Molekulargewicht bis zu 8 C-Atomen zunehmen, um dann wieder abzusinken.

Eine synergistische biochemische Wirkung von Lipasen und Lipoxydasen, wenn sie von einem Mikroorganismus gebildet werden, haben JENSEN und GRETTIE (128) aufgezeigt.

Die Literatur über die Einwirkung von Kochsalz und anderen Salzen, wie sie insbesondere bei der Rohwurstherstellung Verwendung finden, ist von TERPLAN (304) umfassend referiert worden (vgl. auch NIINIVAARA (224)).

2.134 Mechanische Einflüsse

Bei der Lipasegewinnung aus Kulturen von Mycobakterien haben HAWKINS, THURSTON und STEENKEN (93) bei Filtrationsversuchen eine unterschiedliche Beeinflussung der Aktivität festgestellt, die sie nicht nur auf Substratunterschiede, sondern auch auf verschiedene Filterqualitäten zurückführten; so z.B. wurde durch Filtration bei einer bestimmten Porengröße eine vollkommene Inaktivierung der Fermente erreicht.

2.135 Substratspezifität

Eine unterschiedliche Wirkung auf die lipolytischen Mikroorganismen kann auch bei verschiedenartiger Zusammensetzung des zu hydrolysierenden Substrats beobachtet werden. V. MALLINCKRODT-HAUPT (191) fand, daß Trichophytiepilze leichterschmelzbare Glycerinester insbesondere Neutralfette besser spalten als stearinreiche. Unterschiedliche Hydrolyse einiger einfacher Triglyceride und Neutralfette durch Bakterien konnten auch COLLINS und HAMMER (46) nachweisen. Von einer besseren bakteriellen Hydrolysierung natürlicher als synthetischer Triglyceride berichtet NELSON (218).

2.2 Nachweis der hydrolytischen Fettspaltung

Eine Vielzahl von Methoden zum Nachweis der lipolytischen Fähigkeiten von Mikroorganismen ist bisher empfohlen worden, die - nach ihren Hauptkriterien geordnet - betrachtet werden sollen, um einen Überblick über die Entwicklung und den derzeitigen Stand der Methodik zu bekommen. Dabei ist grundsätzlich zwischen histologischen, biologischen und chemischen Nachweismethoden zu unterscheiden.

2.21 Histologischer Nachweis

Aus der großen Gruppe der Lipidnachweise, die alle auf ihrer physikalischen Eigenschaft, der Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln und ihrer Unlöslich-

keit in Wasser basieren (284), kommen nur diejenigen in Frage, die in unterschiedlicher Form Neutralfette und freie Fettsäuren erfassen, wobei die niederen, wasserlöslichen freien Fettsäuren außer Betracht bleiben müssen, da sie, histochemisch gesehen, keinen Lipidcharakter mehr aufweisen.

Bei den histologischen Untersuchungen wurden die morphologischen Änderungen in der Fettstruktur, insbesondere bei den Fetttröpfchen der Milch, untersucht (285, 312, 99) und unter Anwendung verschiedener Färbemethoden die histochemischen Reaktionen beim mikrobiellen Fettabbau.

2.211 Oxazinfarbstoffe

SMITH (279) konnte erstmals mit Oxazinfarbstoffen Neutralfette und freie Fettsäuren differenzieren. Nach seiner Auffassung färben die Oxazinfarbstoffe Neutralfett rot, während Fettsäuren die roten Oxazine in ihre entsprechenden Oxazone überführen sollen (26, 139, 312, 252, 36, 37, 284).

2.212 Kupferverbindungen

BÜRGER (32) führte Untersuchungen zum Nachweis freier Fettsäuren in Lebensmitteln tierischer Herkunft durch und konnte die freien Fettsäuren mit dem Präparat "Ranzol" nachweisen, das nach seinen Angaben neben Alaun und Essigsäure vor allem Kupfersulfat enthielt.

FISCHLER (65) verwendete zur Fettsäurendarstellung in der Hauptsache Kupferacetat und erhielt die Fettsäuren als tiefschwarze Kristalle. Durch Verwendung verschiedener Reagentien nach dem Kupfern konnten störende Bestandteile wie Kalk, Eisen usw. ausgeschlossen werden (vgl. auch ROMEIS (258)).

2.213 Nachweis durch Polarisation

Mit Hilfe der allgemeinen Fettnachweismethoden - z.B. unter Verwendung von Sudan III und IV (284, 258) - werden Lipide angefärbt und dann im polarisierten Licht betrachtet. Dabei zeigen sich die freien Fettsäuren als doppelt lichtbrechende Anteile und teilweise als nadelförmige Kristalle (323 a).

2.22 Biologischer Nachweis

Während die histochemischen Verfahren den mikrobiellen und nicht mikrobiellen Fettabbau gleichsam im Ergebnis darstellen und lokalisieren, können die biochemischen Fähigkeiten von Mikroorganismen, was die Hydrolyse von Fetten anbelangt, u.a. auch auf geeigneten Nährmedien nachgewiesen werden.

2.221 ohne Indikator

SOMMARUGA (283) dispergierte 2% Fett oder Öl in festen Nährböden und züchtete darauf Mikroorganismen, die er dann als lipolytisch ansah, wenn Auflösung der Fett- oder Öltropfchen im Bereich der Kolonien festzustellen war.

Nach der Rinderfettagarmethode von EIJKMAN (59) wurde in einer Petrischale eine Schicht von Rindertalg mit beimpftem Agar übergossen. Durch lipolytische Keime wurde der Talg teilweise verseift. Der Talg nahm dabei opakes und brüchiges Aussehen an. Schwache Lipolyten zeigten keine Reaktion.

Der Methode von SOMMARUGA (283) folgten ORLA-JENSEN (229) und SÖHNGEN (281, 282). Ebenfalls fußend auf dieser Methode arbeiteten BUCHANAN (31), JENSEN und GRETTIE (129) sowie GORBACH, DEDIC und LORENZ (77). ANDERSON (4) hatte die Methode insoweit modifiziert, als er nicht natürliche Fette, sondern Tributyrin im Nährboden dispergierte, das sich durch eine leichte Hydrolysierbarkeit auszeichnet. Auf diese Methode verweist auch DEMETER (55). CORETTI (48) arbeitete ebenfalls mit einem Tributyrinagar beim Nachweis fettspaltender Eigenschaften bei Laktobazillen. Butter im Nährboden dispergierten MOIR und RUSSEL (206); sie konnten jedoch keine überzeugende Hofbildung als Folge der mikrobiellen Hydrolyse nachweisen.

Der Methode von EIJKMAN (59) folgten LERCHE und LAMMERS (177), indem sie Rinderfett mit Gorodkowa-Agar, dem 0,1% Calziumkarbonat zugesetzt war, überschichteten, um damit das Fettspaltungsvermögen von Hefen aus Rohwürsten festzustellen.

2.222 mit Indikator

2.222 1 Kupferverbindungen

CARNOT und MAUBAN (39) gelang es, mit Kupfersulfat die bei der Hydrolyse freiwerdenden Fettsäuren nachzuweisen. Bebrütete Platten fluteten sie mit einer gesättigten Kupfersulfatlösung, wobei sich blaue Kupferseifen bildeten. BERRY (20) verbesserte diese Methode, und erhielt bläulich-grüne Seifen. Dabei sah er die Intensität der Farbe als Maßstab für die lipolytische Aktivität an (vgl. auch WILLIS (329)).

2.222 2 Lackmus, Spiritblue

Mit Hilfe von Lackmuslösung versuchten SAYER, RAHN und FARRAND (264) die durch mikrobielle Fettspaltung freigewordenen Fettsäuren nachzuweisen. Ähnliche Untersuchungen nahm STARR (293) mit einem Spiritblue-Agar vor.

2.222 3 Methylenblau

LOWREKOWICH (183) wies die Fettspaltung in flüssigen Nährmedien nach, indem er mit Talg präparierte Papierstreifen in eine beimpfte Bouillon verbrachte und dann in 0,5%-ige alkoholische Lösung von Methylenblau tauchte. Um störende Reaktionen auszuschalten, wurden die Papierstreifen jeweils vor und nach dem Einbringen in die Methylenblaulösung gewaschen. Lagen lipolytische Keime vor, trat Blaufärbung auf.

2.222 4 Chinablau

HENNEBERG (95) und DEMETER (55) verwendeten als Indikator Chinablau. Dabei riefen Kolonien fettspaltender Mikroorganismen einen Farbumschlag von hellblau nach intensiv dunkelblau hervor.

2.222 5 Nilblausulfat

Nachdem SMITH (279) und THORPE (309) das gleichzeitige Färben von Neutralfetten und Fettsäuren mit Nilblausulfat als histologische Methode untersucht hatten, führten WAKSMAN und DAVISTON (322) Oxazinfarbstoffe als Indikatoren für den kulturellen Nachweis lipolytischer Mikroorganismen ein. TURNER (311) untersuchte die mikrobielle Fettspaltung mit einem Nilblausulfat-Agar und zog zum Vergleich weitere Methoden heran, u.a. unter Verwendung von Sudan IV. Er hält zwar die Wirkungsweise des Indikators für kompliziert, spricht jedoch von einer brauchbaren Nachweismöglichkeit für freie Fettsäuren.

RETTIE (252) kam bei Untersuchungen über die Wirkungsweise von Nilblausulfat zu der Feststellung, daß es zwei färbende Reagentien enthält, ein blaues in Fettsäuren und ein rotes in Neutralfett lösliches Reagens (auch Nilrosa genannt). Ähnliche Untersuchungen über diese Oxazinfarbstoffe führte SMITH (281) durch und erklärte; die Intensität der Rot- und Blaufärbung sei abhängig von der relativen Menge an blauem und rotem Farbstoff in der wässrigen Nilblausulfatlösung, wobei der blauen Farbe blaue Seifen zugrunde lägen, die er als Reaktionsprodukte der Oxazinbase mit den Fettsäuren ansah.

COLLINS und HAMMER (46) sahen den blauen Farbstoff des Nilblausulfats als ein Sulfat des Diäthylaminophenonaphtoxazins an und den roten als das entsprechende Oxazon.

LONG und HAMMER (182) änderten die Nilblausulfatmethode insofern ab, als sie bebrütete Platten mit Nilblausulfatlösung überfluteten, um eine schärfere Differenzierung als bei Überflutung mit Kupfersulfat zu erreichen. Bei ihren Arbeiten über mikrobielle Einflüsse auf Fette stellten CASTELL und BRYANT (41) fest, daß Änderungen des Redox-Potentials für den Farbumschlag verantwortlich seien. Daher hielten sie die Reaktion nicht unbedingt für spezifisch in Bezug auf die hydrolytische Fettspaltung, sahen sie jedoch grundsätzlich als brauchbar an, da man den Fettabbau im allgemeinen damit nachweisen könne. Positive Reaktionen besagen danach im wesentlichen, daß eine mikrobielle Fetthydrolyse stattgefunden habe (vgl. zur Frage der Redoxvorgänge bei Oxazinen COHEN und PREISLER (45 a)).

Für EISENBERG (60) war diese Reaktion spezifisch. Er zählt den Farbstoff zur Gruppe der Chinonimine, außerdem deutete er an, daß Dissozierungsvorgänge die Färbung beeinflussen könnten.

EL SADEK und RICHARDS (61) (vgl. 161) sahen Nilblausulfatnährböden für den Nachweis lipolytischer Mikroorganismen als nicht geeignet an. Die erstgenannten Autoren schlugen als Differenzierungsmedium Agar mit Neutralrot und waxolengrüngefärbtem Triolein vor, oder in Agar gelöstes Anilinblau mit Nilblausulfatfett. DEMETER (55) hat nach Überprüfung des Verfahrens eine abgeänderte, der Untersuchung von Fettspaltern in Milchfett angepaßte Technik empfohlen, räumt jedoch eine gewisse Bakterizidität des Nilblausulfats ein.

Zum Nachweis hydrolytisch wirkender Keime aus Rohwürsten entwickelten WELLHÄUSER (325) und TERPLAN (304) einen speziell auf diese Aufgabenstellung ausgerichteten Nilblausulfatagar in Modifikation des Nilblausulfat-Butteragars nach DEMETER (55). WELLHÄUSER vertritt ebenfalls die Meinung, daß es sich bei Nilblausulfat um das Sulfat des Diäthylaminophenonaphtoxazins handelt, vorliegend in der Oxazin- und der Oxazonform. Während nach seiner Auffassung die fettlösliche Oxazonform die Rotfärbung des Fettes bewirkt, reagiert die Oxazinform mit freien Fettsäuren unter Ausbildung einer Blaufärbung.

2.222 6 Viktoriablau

JONES und RICHARDS (133) überführten Viktoriablau in die basische Form, lösten es in Fett und dispergierten das gefärbte Fett in einem Nährboden. Das Auftreten von Fetthydrolyse wurde durch blaue Höfe um die Kolonien von Fettspaltern nachgewiesen. RATH (250) wollte die Hemmwirkung, die Viktoriablau insbesondere auf Gram-positive Bakterien haben soll, ausschalten und verbesserte die Methode dahingehend, daß er das Differenzierungssubstrat nicht im Nährboden selbst dispergierte, sondern nach Entwicklung der Kolonien diesen damit überschichtete. Die Lipolyse wurde im roten Differenzierungssubstrat durch Ausbildung einer tiefblauen Färbung sichtbar.

2.23 Chemischer Nachweis der Hydrolyse

2.231 Allgemeines

Wenn auch mittels geeigneter Nährböden und Indikatoren (biologische Verfahren) fettspaltende Mikroorganismen zu erkennen sind, so ist auf diese Weise doch nur eine summarische Aussage möglich, die im Hinblick auf Quantität und Qualität

der Abbauprodukte durch geeignete Analysen ergänzt werden muß. Daher sind differenzierte Untersuchungen mit Hilfe chemischer Methoden durchzuführen, um Art und Menge der freigesetzten Fettsäuren feststellen zu können.

Der Gesamtgehalt an freien Säuren in einem Fett läßt sich am einfachsten azidimetrisch bestimmen (144), während zur weiteren Aufschlüsselung so gewonnener Pauschalergebnisse Verfahren zur Anwendung kommen müssen, die zur Auftrennung nahe verwandter Stoffe geeignet sind.

Dazu bieten sich insbesondere chromatographische Trennverfahren an. Dabei wird das zu trennende Gemisch in einem Lösungsmittel gelöst oder in gasförmigem Zustand durch eine Schicht nichtlöslichen Materials (Trennmaterial) geschickt, das die Fähigkeit hat, die einzelnen Komponenten reversibel und unterschiedlich stark zu binden.

Die verschiedenen chromatographischen Verfahren beruhen auf der gemeinsamen Grundlage, daß die gelösten oder gasförmigen Stoffe durch ein zwei- oder mehrphasiges System wandern, wobei es für jeden Stoff zwischen den Phasen zur Einstellung eines charakteristischen Gleichgewichts im Lösungsmittel und Trennmaterial kommt (HOUBEN-WEYL (110)).

Im wesentlichen kommen drei unterschiedliche chromatographische Verfahren zur Anwendung:

Adsorptionschromatographie,
Verteilungschromatographie und
Ionenaustauscherchromatographie.+)

+) Nach zusammenfassenden Darstellungen (110, 291, 17, 136) lassen sich die Verfahren wie folgt erklären:

Die Adsorptionschromatographie beruht auf der Tatsache, daß unterschiedliche Substanzen auf bestimmten Oberflächen unterschiedlich adsorbiert werden. Dabei wandern gutbindende Substanzen langsamer als schlechtbindende, wenn sie in einem Lösungsmittel über die poröse Trennoberfläche geschickt werden. Die Adsorptionschromatographie findet in der Hauptsache bei der Säulenchromatographie Anwendung.

Bei der Verteilungschromatographie ist keine adsorbierende Oberfläche vorhanden, sondern eine stationäre Phase, in der sich die zu

2.232 Säulenchromatographie

Die Säulenchromatographie wird überwiegend nach dem Adsorptionsprinzip durchgeführt; dabei werden Stoffgemische unter Verwendung geeigneter Lösungsmittel über Adsorptionsmittel, wie Aluminiumoxyd, Kieselsäure usw. getrennt (Adsorption und Desorption) (50). Außerdem wird nach dem Verteilungs- und Ionenaustauscher-Prinzip gearbeitet.

Neben der Trennung von Lipidgemischen (89, 247, 335), des Unverseifbaren von Fetten (169, 38) und einer großen Anzahl von spezielleren Trennaufgaben (wie z.B. der Bestimmung von Tocopherolen in tierischen Geweben (24)) wurde das Verfahren häufig zur Trennung von Fettsäuremischungen angewendet.

So wurden Fetthydroxamsäuren (53), ungradzahlige und gradzahlige (137, 94, 51, 85) sowie ungesättigte und gesättigte (137) Fettsäuren in freier oder veresterter Form (263) getrennt. Für die Trennung von Gallensäuren verwendeten NORMAN (226) und SJÖVALL (277) als Säulenfüllung Hyflo-Supercel, während WISS und GLOOR (331) diese Füllung durch Hostalenpulver ersetzten.

Fortsetzung der Fußnote von S. 29

trennenden Substanzen lösen können. Lediglich als Trägermaterial für die stationäre Phase dient adsorbierendes Material. Das zu trennende Substanzgemisch wird in einem Lösungsmittel aufgetragen, das sich mit der stationären Phase nicht mischt. Das Substanzgemisch befindet sich während des Trennvorganges teils in der mobilen (Lösungsmittel) teils in der stationären Phase in einem Gleichgewicht. Mit der ständigen Zugabe von Lösungsmittel kommt es zu einer fortwährenden Neueinstellung des Gleichgewichtes; ständiges Herauslösen aus der stationären Phase und wieder "Hineinlösen". Die Verteilungschromatographie findet in der Säulen-, Papier- und Gaschromatographie ihre Anwendung.

Mit Hilfe der Ionenaustauscherchromatographie lassen sich im wesentlichen Stoffgemische trennen, deren Komponenten in Ionenform vorliegen. Die Trennung erfolgt auf einer stationären Phase, die selbst positiv oder negativ geladene Gruppen enthält (z.B. Harze). Dabei ergeben sich Reaktionen zwischen den zu trennenden Substanzen und dem Trennmittel unter Salzbildung. Die Eluierung erfolgt mit salzhaltigen Lösungsmitteln. Bestimmte säulenchromatographische Verfahren beruhen auf dem Prinzip der Ionenaustauscherchromatographie.

2.233 Papierchromatographie

Die Papierchromatographie, bei der ein Fließpapier (Filterpapier) als Trennmedium fungiert, ist schnell und einfach zu handhaben (180, 34). Ihre Anwendung bei der Untersuchung von Lebensmitteln (19) im allgemeinen und der Fettforschung (143, 116, 240, 189, 146, 259) im besonderen hat zur Lösung der verschiedensten Trennprobleme geführt.

WEGMANN, CECCALDI und BIEZ (324) haben Fette und Fettsäuren papierchromatographisch getrennt; gesättigte und ungesättigte Fettsäuren trennten u. a. BUCHANAN (30), HAL'AMA (84); Oxystearinsäuren wurden von WINSAUER (330) isoliert. CHOWDHURY, CHANDRA und MUKHERJI (43) konnten im Samenöl von Basella rubra relativ viel Ölsäure feststellen. UENO (313) beschrieb eine Methode zur papierchromatographischen Trennung niederer aliphatischer Fettsäuren. Kritische Paare von Fettsäuren konnten JOVTSCHEFF, POPOFF, MICEV und SPASSOV (135) nach Brom-Methyloxylierung trennen. Als einfaches Verfahren wird von BARNABAS und BARNABAS (16) die Rundfilterchromatographie beschrieben, die nach NOVOTNY, LÜDERITZ und WESTPHAL (227) besonders zur Trennung langkettiger Fettsäuren geeignet ist. NODA und HIRAYAMA (225) verwendeten bei der rundfilterchromatographischen Trennung von Glyceriden und Fettsäuren als stationäre Phase Kohlenwasserstoffe, Dodecylbenzol und Tetralin; sie eluierten mit 90%iger Essigsäure oder Methanol/Essigsäure. Zum Nachweis der Fettsäuren behandelten sie nacheinander das Papier mit 0,5%iger Bleiacetat-Lösung, Wasser und Ammoniumsulfit-Lösung. Als selektiven Nachweis für ungesättigte Fettsäuren benutzten sie als Sprühmittel 2%ige Jodlösung in Äthanol. Ungesättigte Glyceride wurden in Form ihrer Quecksilberacetat-Addukte chromatographiert und durch Besprühen mit einer 0,2%igen Diphenylcarbazon-Lösung in Äthanol oder mit einer Sudanschwarz-Lösung nachgewiesen.

KAUFMANN und NITSCH (149) konnten höhere Fettsäuren von Caprin- bis Stearinsäure mit Hilfe der Verteilungschromatographie auf Papier trennen, wobei sie zur Vermeidung gegenseitiger Beeinflussung der Fettsäuren Eisessig/Wasser-Gemische als mobile Phase benutzten.

Als einfache und schnelle papierchromatographische Methode zur Trennung von Fettsäuren beschrieb GORBACH (76) das "Test-Tube" -Verfahren. Zusammen mit WEBER (78) wies er damit Verunreinigungen des Kürbiskernöls mit Raps-, Soja-, Lein- und Sonnenblumenöl nach.

Die quantitative Papierchromatographie höherer Fettsäuren führten SMIRNOV, POPOVA und NISKANEN (278) nach Methylierung mit radioaktivem Diazomethan durch mit anschließender radiographischer Auswertung der Chromatogramme. Eine Übersicht über die Möglichkeiten der Glaspapierchromatographie von Lipiden geben HAMILTON und MULDREY (87, vgl. auch 118, 154, 153, 307).

2.234 Dünnschichtchromatographie

Bei der Dünnschichtchromatographie handelt es sich um eine Schnellmethode, die zur Untersuchung von Lipiden und ihren Komponenten besonders geeignet ist (290). Neben dem Nachweis von Antioxydantien (274, 275), Farbstoffen (207) und anderen Zusatzstoffen sind Lipide, ihre Komponenten und Abbauprodukte getrennt worden. So haben KAUFMANN und MAKUS (145) Fettsäuren, Ketosäuren, Monoglyceride und Fettaldehyde getrennt. Komplizierte Lipidgemische konnten MALINS und MANGOLD (192) trennen.

Zur quantitativen Bestimmung von Fettsäureestern benutzten VIOQUE und HOLMANN (315) Silicagel-Platten, trugen Flecke und Zonen ab, extrahierten und stellten die Eisenhydroxaminsäure-Komplexe dar, die sie kolorimetrisch auswerteten. Sie trennten auf diese Art Epoxy-, Monohydroxy- und Dihydroxyfettsäureester außerdem Mono-, Di- und Triglyeride. Zur Trennung von Molekülen, die sich lediglich in der Zahl der Doppelbindungen und ihrer Konfiguration unterscheiden, eignet sich nach DE VRIES und JURRIENS (320) mit Silbernitrat imprägniertes Kieselgel. KLOUVEN, TER HEIDE und KOK (162) konnten mit Hilfe von 3 Lösungsmitteln 2,4-Benzaldehyd-Derivate dünnschichtchromatographisch trennen. KAUFMANN und WESSEL (152) untersuchten die Zusammensetzung von Sonnenblumenöl und trennten nach Vorfraktionierung auf Silbernitratplatten Triglyceride im Umkehrphasensystem.

Möglichkeiten zur Anfärbung dünnschichtchromatographischer Platten untersuchten KAUFMANN, MAKUS und KHOE (147). Sie verwendeten Kupferacetat, Rubeanwasserstoffsäure und Quecksilberacetat-Diphenylcarbazon, während KAUFMANN und VISWANATHAN (151) zur Sichtbarmachung der getrennten Substanzen Phosphormolybdänsäure benutzten.

2.235 Gaschromatographie

Als jüngstes chromatographisches Verfahren hat die Gaschromatographie in die Analytik Eingang gefunden. Die zu trennenden Substanzen werden gasförmig in einem kontinuierlichen Trägergasstrom durch die Trennsäule gegeben. Entsprechend der unterschiedlichen Löslichkeit in der stationären Phase trennen sich die einzelnen Substanzen und treten in Intervallen aus.

Das Retentionsvolumen ist diejenige Trägergasmenge, die nötig ist, um eine Substanz durch die Säule zu leiten:

$$V_R = v(t_K - t_L)$$

v = Strömungsgeschwindigkeit (ml/min)
t_L = Zeit, die ein Trägergasteilchen zum Durchströmen der Säule braucht
t_K = Zeit, die eine Komponente des Substanzgemisches zum Durchströmen der Säule braucht

Daneben wird auch mit der Retentionszeit t_R gearbeitet. Hierbei wird das Volumen nicht berücksichtigt.

Die theoretischen Grundlagen sind eingehend von PHILLIPS (241), KEULEMANS (157), KAISER (136) und BAYER (17) beschrieben worden.

Besonders in der Lebensmittelforschung hat die Gaschromatographie einen weiten Anwendungsbereich gefunden. Nahezu bei allen Nahrungs- und Genußmitteln sind gaschromatographische Untersuchungen gemacht worden, wobei Fleisch und Fleischerzeugnisse (142, 328, 91, 107, 224, 62, 230), Milch und Milchprodukte (124, 90, 115, 82, 308, 188, 101, 57, 261) sowie Fette im weitesten Sinne (200, 333, 45, 316, 10, 150, 299, 81, 310, 251) eine wesentliche Rolle spielen.

Da die Flut an gaschromatographischen Arbeiten über Fettsäuren derart ansteigt, daß eine Orientierung nur noch über periodische Veröffentlichungen von Literaturübersichten möglich ist, soll auf eine systematische Literaturbesprechung in der vorliegenden Arbeit verzichtet werden.

Wegen der physikalischen, chemischen und apparativen Grundlagen der Methodik sei auf zusammenfassende Darstellungen verwiesen (244, 13, 199, 12, 178, 121, 49, 45, 18).

Nahezu alle Arten von Fettsäuren sind gaschromatographisch getrennt worden: flüchtige (8, 9, 57, 270, 72, 193, 125, 230) und nichtflüchtige (203, 179, 333, 306, 123), ungradzahlige und gradzahlige (92, 185), kurzkettige und langkettige ((120, 108, 28, 122) vgl. zur Bestimmung der Kettenlänge (58, 94)), gesättigte und ungesättigte ((160, 262, 134, 141) vgl. zur Differenzierung von ungesättigten und gesättigten insbesondere (170, 58) und zur Bestimmung des Grades der Ungesättigtkeit (217, 294)), grad- und verzweigtkettige (246, 119, 1), Hydroxyfettsäuren (208, 126, 132), Isomeren (268) und synthetische Fettsäuren (111).

Die einfachste Methode zur Untersuchung von Stoffgemischen ist die Überführung in die dampfförmige Phase und die direkte Eingabe über ein Gasprobeneinlaßteil in den Gaschromatographen. Für Gemische niederer freier Fettsäuren sowie für ihre flüchtigen Abbauprodukte wurden derartige Verfahren u.a. von BUTTERY, TERANISH (35) und PALITZSCH (230), der die einschlägige Literatur umfassend referierte, beschrieben.

Zur Trennung von Fettsäuren, die an Glycerin gebunden sind, wird zunächst eine hydrolytische Spaltung durchgeführt (112, 198, 57).

Wenn Fettsäuregemische, die Komponenten mit höheren C-Atom-Zahlen enthalten, gaschromatographisch getrennt werden sollen, empfiehlt es sich, sie zunächst in Verbindungen überzuführen, deren Dampfdruck bei denjenigen Temperaturen hinreichend groß ist, bei denen die Zersetzungsgefahr noch nicht zu groß ist. Da bei freien Fettsäuren die Dimerisierungsrate zu hoch ist, wird allgemein, insbesondere bei höheren Fettsäuren, ihre Veresterung vorgeschlagen. Die Ester besitzen gegenüber den freien Säuren einen höheren Dampfdruck (127).

Als geeignet wurden die verschiedensten Ester der Fettsäuren beschrieben: Äthylester (170, 11, 296, 83), Chloräthylester (63), Butylester (44, 40), Isobutylester (296), Propylester (173), Isopropylester (173, 255), Allylester (201) und in überwiegender Zahl der Untersuchungen Methylester.

Zur Methylveresterung der frei vorkommenden oder durch Hydrolyse freigesetzten Fettsäuren wurden verschiedene Methoden beschrieben; sie beruhen im wesentlichen auf der Verwendung von:

1. Methanol mit Säurezusatz,
2. Diazomethan und
3. Methanol mit Bortrifluoridzusatz.

Vergleichende methodische Untersuchungen finden sich bei METCALFE und SCHMITZ (204), VORBECK, MATTICK, LEE und PEDERSON (317), KAUFMANN und MANKEL (148) u.a. (weitere Hinweise zur Diazomethanmethode gibt u.a. RYBICKA (260) und zur Bortrifluoridmethode NIESAR (222)).

Die besondere Eignung der Gaschromatographie zur Bewältigung schwieriger Trennprobleme macht sie in vielen Fällen zum Mittel der Wahl. Das schließt jedoch nicht aus, daß ihr Wirkungsgrad durch die Kombination mit anderen Verfahren gesteigert werden kann. So werden der gaschromatographischen Trennung nicht selten andere chromatographische Trennverfahren, wie Säulenchromatographie oder Dünnschichtchromatographie (192, 194) vorgeschaltet. Daneben kommen auch eine Reihe nichtchromatographischer Trennverfahren, insbesondere fraktionierte Destillation und Kristallisation (47) zur Anwendung.

Daneben wurden die gaschromatographisch getrennten Substanzen nach präparativer Aufarbeitung (Fraktionssammler) (3, 14) weiteren Untersuchungen unterworfen, dabei kamen in der Hauptsache folgende Verfahren zur Anwendung: Ultraviolett-Spektrometrie (190, 70, 272), Infrarot-Spektrometrie (210, 140, 579, 327) und Massen-Spektrometrie (22, 23, 202).

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Histologische Untersuchungen

3.11 Nilblausulfatfärbung

Dem Zentrum gereifter und gelagerter Rohwürste wurden Blöcke entnommen, mit 1 : 4 verdünntem Formalin fixiert und nach gründlichem Wassern Gefrierschnitte angefertigt, die in aqua dest. aufgefangen wurden. Die Schnitte wurden 20 Min. in gesättigter, wäßriger Nilblausulfatlösung gefärbt, 1 - 12 Min. in mehrfach gewechseltem Wasser gewässert, auf Objektträger aufgezogen und nach dem Trocknen mit Glycerin-Gelatine eingedeckt. Zum Vergleich wurden aus frischem Schweinespeck entsprechende Schnitte angefertigt.

Die roten Anteile der Fettpartikel wurden als Neutralfette und die blauviolett bis blau gefärbten im wesentlichen als freie Fettsäuren angesehen.

Ergebnisse:
Die Untersuchungen zeigten, daß die blauen Anteile auf die äußeren Zonen der Fettpartikel beschränkt waren. Die Fettstückchen aus frischem Schweinefettgewebe wiesen quantitativ eine geringere Blaufärbung auf als die aus Rohwürsten.

Besprechung der Ergebnisse:
Die geringere Blaufärbung in den Schnitten aus frischem Schweinefettgewebe gegenüber denen aus Rohwurstfettstückchen wies auf eine Zunahme der freien Fettsäuren in Abhängigkeit von der Zeit hin. Das stärkere Auftreten von blaugefärbten Anteilen in den Randzonen ließ einen zentripetalen Verlauf der hydrolytischen Fettspaltung annehmen.

3.12 Betrachtung im polarisierten Licht bei Sudanfärbung

Die entsprechend 3.11 hergestellten Gefrierschnitte wurden zunächst 3 Min. mit Haemalaun gefärbt und nach 30-minutigem Wässern mit Sudan III (1 g auf 100 ml 70%ig. Alkohol). Nach Differenzierung in 50%igem Alkohol und anschließendem Wässern wurden die Schnitte auf Objektträger aufgezogen und nach dem

Trocknen mit Glycerin-Gelatine eingedeckt. Die mikroskopische Betrachtung erfolgte unter Verwendung eines Polarisationsfilters.

Als Fettsäuren wurden diejenigen doppeltlichtbrechenden Anteile angesehen, die - im Gegensatz zu Bindegewebsanteilen - im unpolarisierten Licht Rotfärbung aufwiesen. Darüberhinaus konnten Fettzellen weitgehend morphologisch differenziert werden ebenso teilweise rosettenförmig angeordnete nadelförmige Fettsäurekristalle.

Ergebnisse:
In den Schnitten aus frischem Schweinefettgewebe war eine gleichmäßige, geringgradige Verteilung von doppeltlichtbrechenden Anteilen festzustellen. Die Zellgrenzen der Fettzellen waren gut zu erkennen. Bei den Schnitten aus Rohwurstblöcken waren die doppeltlichtbrechenden Anteile in starkem Maße vertreten. Sie konzentrierten sich vornehmlich auf die Randzonen. Teilweise waren deutliche doppeltlichtbrechende Kristalle, die rosettenförmig angeordnet waren, zu erkennen. Sie wurden als Fettsäurekristalle angesehen.

Besprechung der Ergebnisse:
Die Folgerungen aus festgestellter Intensität und Lokalisation der doppeltlichtbrechenden Anteile entsprechen den unter 3.11.

3.2 Biologische Untersuchungen

Es wurden aus Lebensmitteln tierischer Herkunft und aus Eutern mastitiskranker Kühe isolierte und differenzierte Mikroorganismen untersucht.+)

3.21 Tributyrin-Agar

Es wurde der Tributyrin-Agar nach ANDERSON (4) und DEMETER (55) verwendet.

+) Die Stämme wurden mir freundlicherweise von Frau Vera Mursić, Fräulein Gundula Bochum, Herrn Univ.-Doz. Dr. G. Terplan und Herrn Dr. W. Kundrat zur Verfügung gestellt.

Zu einem gewöhnlichen Agar (Standard II, Merck, p_H 7,2) wurden 1% neutrales Tributyrin und 0,1% Tween 80 als Emulgator (86) zugesetzt. Das Nährmedium wurde durch Erhitzen im Dampftopf sterilisiert. Um eine möglichst homogene Emulsion zu bekommen, wurde der Nährboden vor dem Ausgießen bis in die Nähe des Erstarrungspunktes (45 - 43°C) abgekühlt, kräftig geschüttelt und dann in gut gekühlte Petrischalen ausgegossen, um ein nachträgliches "Aufrahmen" der Triglyceridkügelchen zu verhindern. Durch die feine Verteilung von Tributyrintröpfchen wurde der Nährboden trüb und undurchsichtig (milchglasähnlich). Die Platten wurden aus Schrägagarkulturen beimpft und drei Tage bei 30°C bebrütet. Lipolytische Keime zeigten, je nach Aktivität der Stämme, entlang der Impfstriche mehr oder weniger breite durchsichtige Zonen.

Ergebnisse: Tab. 1 (s.S. 43)

3.22 Schweineschmalz-Agar ohne Indikator

In Modifikation des Tributyrin-Agars nach ANDERSON (4) wurde als Tryglyceridzusatz frisches Schweineschmalz in Konzentrationen von 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; und 2,5% zugesetzt.

Ergebnisse: Tab. 1 (s.S. 43)

3.23 Chinablau-Agar

In Anwendung der Chinablau-Methode nach HENNEBERG (95) und DEMETER(55) wurden Röhrchen mit geschmolzenem Agar (Standard II, Merck, p_H 7,2) nach Abkühlung auf etwa 70 - 80°C zur Vermeidung von Reduktionsvorgängen je 1 Tropfen einer sterilen 5%igen Chinablaulösung zugesetzt. Anschließend wurde je 1 ml steriles Schweineschmalz (fraktionierte Sterilisation im Dampftopf über drei Tage) hinzugefügt. In einem zweiten Ansatz wurden statt eines drei Tropfen Chinablaulösung zugesetzt. Zur Erreichung einer möglichst homogenen und beständigen Emulsion wurde entsprechend 3.21 verfahren. Der Chinablau-Agar zeigte blaugrüne Färbung, die bei Zusatz von drei Tropfen intensiver war, und eine milchige Trübung. Nach Überimpfen von Schrägagarkulturen wurden die Platten 3 Tage bei 30°C sowie weitere 2 Tage bei Zimmertemperatur unter Lichtabschluß aufbewahrt. Lipolytische Mikroorganismen bewirkten im Bereich der Kolonien einen Farbumschlag nach intensiv dunkelblau.

Ergebnisse: Tab. 1 (s.S.43)

3.24 Nilblausulfat

3.241 Nilblausulfat-Agar

Der von WELLHÄUSER (325) und TERPLAN (304) modifizierte Nilblausulfat-Butteragar nach DEMETER (55) wurde wie folgt hergestellt: Ein Nähragar aus 10 g Hefeextrakt (Difco), 30 g Pepton Witte, 20 g Agar, 1000 ml Aqua dest., pH 7 - 7,2 wurde zu je 9 ml in Reagenzgläser abgefüllt und an 3 aufeinanderfolgenden Tagen im Dampftopf sterilisiert. Einer Mischung aus 60 ml eines erwärmten frischen Schweinefettes und 20 ml heißen destillierten Wassers wurde 1 ml einer 1%igen Nilblausulfatlösung zugesetzt. Durch Zugabe einer 1 n Natronlauge wurde die Mischung neutralisiert, bis das Nilblausulfat in der wäßrigen Phase schwach blau war, und unter häufigem Schütteln 30 Min. erhitzt. Dabei färbte sich das Fett intensiv rot. Nach Abgießen der wäßrigen Phase wurde das Fett in sterile Kölbchen abgefüllt und zweimal je eine halbe Stunde im Dampftopf erhitzt. Die bei der Aufbewahrung im Kühlschrank entstehende violette bis dunkelblaue Farbe schlug bei erneutem Erhitzen sofort wieder in rot um.

In Abänderung hierzu wurde eine 1%ige Nilblausulfatlösung unter Verwendung von Leitungswasser hergestellt und bis zur völligen Dispergierung des Farbstoffes gekocht. Nach Zusatz von 10%iger Natronlauge bildete sich ein dunkelbrauner Niederschlag, der abfiltriert, mit ammoniakalischem Wasser gewaschen und mit Petroläther aus dem Filterpapier extrahiert wurde, wobei dieser eine ziegelrote bis rot-orange Farbe annahm. Hierin gelöstes Schweinefett blieb nach dem Abdampfen des Lösungsmittels im Vakuumrotationsverdampfer als rotes Fett zurück ("kalte" Fettfärbung).

Den Reagenzgläsern mit dem geschmolzenen Nähragar wurden je 1 ml des Nilblausulfat-Fettes zugesetzt. Die weitere Bearbeitung wurde entsprechend 3.21 durchgeführt. Die Platten zeigten eine durch die Fettkügelchen bedingte blaßrosa, milchige Farbe.

Nach Überimpfen aus Schrägagarkulturen wurden die Platten 3 Tage bei 30°C bebrütet und weitere 2 Tage unter Lichtabschluß bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Lipolytische Keime riefen eine Blaufärbung auf dem Nährboden hervor, deren Intensität und Ausbreitung je nach Aktivität der Keime verschieden groß war.

Ergebnisse: Tab. 1 (s.S. 43)

3.242 Nilblausulfat-Streifentest

Sterile Fließpapierstreifen von 20 cm Länge und 1 cm Breite wurden mit sterilem Nilblausulfat-Fett präpariert und nach dem Festwerden in Reagenzgläser mit 2 Tage bei 30°C bebrüteter Nährbouillon verbracht. Das Ganze wurde 4 Tage bei 30°C und anschließend unter Lichtabschluß weitere 3 Tage bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Fettspaltung war dann gegeben, wenn oberhalb des Bouillonspiegels der Fettpapierstreifen Blaufärbung eingetreten war, wobei das Ausmaß der blau gefärbten Zonen einen Hinweis auf die Aktivität der Fettspalter gab.

Ergebnisse: Tab. 1 (s.S. 43)

3.243 Nilblausulfat-Ringprobe

20 ml steriles Nilblausulfat-Fett wurde in der gleichen Menge Petroläther gelöst. 2 ml dieser Fettlösung wurden 2 Tage alten bei 30°C bebrüteten Bouillonkulturen zugegeben, die anschließend 2 Tage bei 30°C und 3 Tage unter Lichtabschluß bei Zimmertemperatur aufbewahrt wurden. Die Fettspaltung war an einem schmalen blauen Ring oberhalb des Bouillonspiegels, d.h. an der Unterseite der Nilblausulfat-Fettschicht zu erkennen. Die Dicke des Ringes ließ auf die Intensität der Fettspaltung schließen.

Ergebnisse: Tab. 1 (s.S. 43)

3.25 Viktoriablau

3.251 Viktoriablau-Ringagar

In Modifikation der Viktoriablau-Methode nach RATH (250) wurde der Nährboden wie folgt hergestellt: Ein 1,5%iger Wasseragar ohne weitere Zusätze wurde in dünner Schicht in Petrischalen ausgegossen, dem pro Platte 4 - 6 sterile Glasringe von 1 cm Höhe und 2,5 cm Durchmesser heiß aufgesetzt wurden, so daß sie einschmolzen.

Der Nährboden zur Füllung der Glasringe wurde aus 8 g Bactopepton, 2 g Hefeextrakt, 5 g Kochsalz und 15 g Agar, die in 1000 ml Wasser gelöst und mit 20 ml Schweineschmalz versetzt wurden, hergestellt. Unter häufigem Schütteln wurden jeweils 2 ml in Reagenzgläser verbracht und an 3 aufeinanderfolgenden Tagen im Dampftopf sterilisiert.

Das Differenzierungsmedium bestand aus einer mit Viktoriablaubase gefärbten frischen Margarine. Zu diesem Zweck wurden 3 g Viktoriablau in 300 ml Leitungswasser bis zur völligen Dispersion gekocht. Der noch heißen Lösung wurde solange 10%ige Natronlauge zugesetzt, bis sich ein dunkelbrauner Niederschlag bildete, der nach Abgießen des überstehenden Wassers mehrmals mit ammoniakalischem Wasser nachgewaschen, filtriert und bei 30°C 2 - 3 Tage getrocknet wurde. Der getrocknete Farbstoff wurde im Mörser pulverisiert und verschlossen aufbewahrt.

Die frische Margarine für das Differenzierungssubstrat wurde in einer gleichen Menge Leitungswasser eine halbe Stunde gekocht und anschließend unter ständigem Rühren solange mit der Viktoriablaubase versetzt, bis das Fett eine tiefrote Farbe angenommen hatte. Nachdem die als blaue Seifen oder Salze ausgefallenen höheren freien Fettsäuren und die ebenfalls blau gefärbten nicht fettartigen Bestandteile der Margarine abfiltriert worden waren, wurde das Fett eine weitere halbe Stunde bei schwacher Flamme gekocht. Anschließend wurde es abpipettiert, wobei darauf geachtet wurde, daß keine Wassertropfen mit erfaßt wurden, und an 3 aufeinanderfolgenden Tagen im Dampftopf sterilisiert. Bei der Aufbewahrung im Kühlschrank trat ein Farbumschlag in violett bis blau ein, beim Erhitzen nahm das Fett jedoch wieder einen roten Farbton an. Der für die Glasringe bestimmte Nährboden wurde nach Verflüssigung bis in die Nähe des Erstarrungspunktes heruntergekühlt und mit einem Tropfen einer 2 Tage bei 30°C bebrüteten Nährbouillon beimpft. Nach kräftigem Schütteln wurde der beimpfte Fettagar in einer Schichtdicke von 1 - 2 mm in die Ringe der gut gekühlten Platten gegossen, um ein nachträgliches "Aufrahmen" zu verhüten. Die Platten wurden 6 Tage bei 30°C bebrütet. Anschließend wurde dem Nähragar in den Ringen das Differenzierungssubstrat überschichtet. Ein Farbumschlag nach Blau, der sich unterschiedlich schnell (nach Minuten bis Tagen) einstellte, war ein Hinweis auf Fettspaltung. Die Intensität der Farbe wurde als Maßstab für den Grad der Fettspaltung angesehen.

Ergebnisse: Tab. 1 (s.S. 43)

3.252 Viktoriablau-Schrägagar

3.252 1 mit Schweinefettzusatz

Nähragar und Differenzierungssubstrat wurden entsprechend 3.251 verwendet. Der Fettagar wurde zu je 10 ml in Reagenzgläser abgefüllt, an 3 aufeinanderfolgenden Tagen im Dampftopf sterilisiert und nach Abkühlen auf 45 - 43°C mit 0,5 ml einer bebrüteten Nährbouillon beimpft. Nach kräftigem Schütteln wurden die Reagenzgläser schräg in das Eisfach eines Kühlschrankes gelegt, worauf die Emulsion ohne Entmischung erstarrte. In einer weiteren Versuchsanordnung wurde anstelle eines Zusatzes bebrüteter Nährbouillon Strichbeimpfung aus Schrägagarkulturen vorgenommen. Die beimpften Schrägagarröhrchen wurden 6 Tage bei 30°C bebrütet und mit je 2 ml Differenzierungssubstrat überschichtet. Wie bei dem Viktoriablau-Ringagar gab eine tiefblaue Färbung über das Vorhandensein von fettspaltenden Mikroorganismen Aufschluß.

Ergebnisse: Tab. 1 (s.S. 43)

Besprechung der Ergebnisse zu 3.21 bis 3.252 1:

Die meisten positiven Fettspaltungsreaktionen wurden auf Tributyrin-Agar festgestellt. Dann folgten die Viktoriablau- und Nilblausulfat-Nachweise. Der Schweinefett-Agar und der Chinablau-Agar ergaben nur vereinzelt positive Reaktionen, weshalb sie als wenig empfindlich angesehen werden müssen.

Tabelle 1: Biologische Nachweise der Fettspaltung, Einfluß von Tween 80 auf das Keimwachstum

Gattung: Streptococcus (Str), Gram positiv

Nr.	Trib	SFolTween		Chbl	Nilblausulfat			Viktoriablau	
		Sp	Wachst		Agar	Str	RgPr	RgAg	SchrAg
1	-	-	-		-				-
2	-	-		-	-				-
3	-	-		-	-				-
4	-	-	0,1	-					-
5	-	-	0,1	-	-				±
6	-	-		-	-				-
7	-	-	0,1	-	-				-
8	-	-	1,0	-	-				-
9	-	-	0,3	-	-				-
10	±	-	0,3	-	-				±
11	-	-		-	-				±
12	-	-	0,3	-	-				-
13	-	-	0,1	-	-				-
14	-	-		-					±
15	-	-	0,3	-					±
16	-	-	0,3	-	-				-
17	-	-	0,1	-	-				-
18	-	-		-	-				-
19	-	-		-	-				-
20	-	-		-	-				-
21	-	-	0,1	-	-				-
22	-	-	0,1	-	-				-

Zeichenerklärung:

Trib: Tributyrin mit Tween-Zusatz; SFolTween: Schweinefett mit Tween-Zusatz, ohne Indikator; Sp: Spaltung; Wachst: Tween-Konzentration, ab der Wachstumshemmung erfolgt (bei normalem Wachstum keine Angabe); Chbl: Chinablau-Agar; Str: Streifentest; RgPr: Ringprobe; RgAg: Ringagar; SchrAg: Schrägagar; +++: stark positiv; ++: mittelgradig positiv; +: positiv; ±: schwach positiv bis zweifelhaft; -: negativ; ?: unklare Reaktion

Fortsetzung Tabelle 1

Nr.	Trib	SFoI	Tween	Chbl	Nilblausulfat			Viktoriablau	
		Sp	Wachst		Agar	Str	RgPr	RgAg	SchrAg
23	± -	-		-	-				-
24	-	-	0,1	-	± -				-
25	-	-		-	-				-
26	-	-	0,1	-	-				-
27	-	-		-	-				-
28	-	-	0,3	-	-				-
29	-	-	0,1	-	-				-
30	-	-		-	-				-
31	-	-	0,3	-	± -				-
32	-	-		-	-				-
33	-	-		-	-				-
34	-	-		-	-				± -
35	-	-		-	-				-
36	-	-		-	-				-
37	-	-	0,1	-	-				?
38	-	-		-					-
39	-	-	0,1	-	-				-
40	-	-		-	-				-
41	-				-				
42	-				-				
43	-				-				
44	-				-				
45	-				-				
46	-				-				
47	-				-				
48	-				-				
49	-				± -				
50	-								
51	-				-				
52	-				-				
53	-				-				
54	-				-				
55	-				-				-
56	-				-				-

Fortsetzung Tabelle 1

Nr.	Trib	SFolTween		Chbl	Nilblausulfat			Viktoriablau	
		Sp	Wachst		Agar	Str	RgPr	RgAg	SchrAg
57	-				-				-
58	-				-				-
59	-								-
60	-				-				-
61	-				-				-
62	-				-				-
63	-				-				-
64	-				-				-
65	-				-				-
66	-				-				-

Gattung: Staphylococcus (Staph), Gram positiv

67	-	-		-	-	-	-	-	-
68	-	-		-	-	-	-	-	-
69	±	-	1,0	-	-	-	-	-	-
70	+ -	-	-	-	-	-	-	-	?
71	+ -	-		-	++	-	+ -	+	+
72	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-
73	+ -	-	0,3	-	-	-	-	-	-
74	+++	-		-	-	-	-	+	+
75	±	-		-	-	-	-	-	-
76	+	-		-	-	-	-	+	++
77	-	-		-	-	-	-	-	-
78	-	-	0,1	-	-	-	-	?	-
79	-	-		-	-	-	-	±	-
80	+ -	-	-	-	+	-	-	-	-
81	+ -	-		-	-	-	-	-	-
82	+	-		-	-	-	-	+	+ -
83	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-
84	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-
85	±	-	0,1	-	-	-	-	+ -	+
86	-	-		-	+	-	-	-	-
87	+	-		-	+	+	-	+	+
88	+ -	-		-	+	+	-	+	+

Fortsetzung Tabelle 1

Nr.	Trib	SFoI Sp	Tween Wachst	Chbl	Nilblausulfat Agar	Str	RgPr	Viktoriablau RgAg	SchrAg
89	+ -	-		-	-	-	-	+ -	-
90	-	-		-	-	-	-	-	-
91	+	-		-	-	-	-	+	-
92	+	-		-	+	+	-	+	+
93	++	+ -		-	-	-	-	+	+
94	+	-		-	-	-	-	+	+
95	-	-		-	-	-	-	-	-
96	+++	+		-	++	++	+	+++	++
97	++	-	1,0	-	++	+	-	++	++
98	-	-	1,0	-	-	-	-	-	-
99	-	-		-	-	-	-	-	-
100	-	-		-	-	-	-	-	-
101	+	+ -		-	+	+	-	+	+
102	-	-	1,0	-	+	-	-	-	-
103	-	-	1,0	-	-	-	-	-	-
104	+ -	-		-	+ -	-	-	+ -	+ -
105	+ -	-		-	+	+	-	+ -	+
106	-	-		-	+	-	-	-	-
107	?	-		-	++	+	+	+	+
108	+	-		-	-	-	-	+	++
109	+	-		-	+	+	-	+	+
110	-	-		-	?	-	-	-	-
111	-	-		-	?	-	-	-	-
112	+ -	-		-	+	-	-	-	-
113	++	-		-	+	-	-	++	++
114	+	-		-	++	-	?	++	+
115	+++	+ -		-	-	+ -	-	++	+++
116	+++	-		-	-	-	-	+	+
117	+++	-		-	-	+	-	++	++
118	+++	-		-	-	-	-	+	+
119	+	-		-	+	-	-	-	-
120	-	-		-	-	-	-	-	-
121	+	-		-	-	+	-	++	+
122	+	-		-	-	-	-	-	-

Fortsetzung Tabelle 1

Nr.	Trib	SFoITween		Chbl	Nilblausulfat			Viktoriablau	
		Sp	Wachst		Agar	Str	RgPr	RgAg	SchrAg
123	+	-		-	-	-	-	+	±
124	++								++
125	+++								++
126	-								-
127	+++								+++
128	+++								+++
129	+								+
130	++								±
131	+++								++
132	++								++
133	++								++
134	++								++

Gattung: M i c r o c o c c u s (Micr), Gram positiv

135	+++	+		-	+++	++	+	++	+
136	-	-		-	-	-	-	-	-
137	±	-		-	+	-	-	+	+
138	-	-		+	-	-	-	+	+
139	+++	-		-	+	-	-	++	++
140	±	?		-	++	++	-	+	+
141	+	-		+	++	+	+	+	+
142	+++	+		-	++	+	±	++	++
143	+	-		-	+	-	-	+	+
144	±	-		-	-	-	-	±	?
145	+++	-		-	+++	++	+	++	+
146	+++	+		-	+++	+++	+	++	++
147	±	-		-	+	-	?	+	+
148	+++	-		-	+++	+	-	++	+
149	-	-		-	-	-	-	+	+
150	+++	±		-	+++	++	+	++	+
151	±	-	0,3	-	-	-	-	-	-
152	+	-	0,1	-	+++	+++	+	++	++
153	±	-		-	-	-	-	-	-

Fortsetzung Tabelle 1

Nr.	Trib	SFoI Sp	Tween Wachst	Chbl	Nilblausulfat Agar	Str	RgPr	Viktoriablau RgAg	SchrAg
154	+/-	-		-	+	+	-	+	+
155	+	+/-		-	-	-	-	+	+
156	+	-	0,1	-	-	-	-	+	+
157	+	-	0,1	-	-	-	-	+	+
158	+/-	-		-	-	-	-	+	+
159	+/-	-		-	-	-	-	+	+
160	++	+		+	+++	+	-	+	++
161	-	-		-	-	-	-	-	-
162	+/-	-		-	+	-	-	-	+/-
163	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-
164	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-
165	++	-		-	+/-	-	-	+	+
166	+/-	-		-	+/-	-	-	+/-	+
167	+	-	1,0	-	+	+	-	++	+
168	+++	-		-	?	+/-	-	++	+++
169	-	-		-	?	-	-	-	-
170	+/-	-		-	-	-	-	?	+/-
171	+	-		+	-	+	-	++	+++
172	-	-		-	-	?	-	-	-
173	+	-		-	++	+	-	+	+
174	+	+/-		-	++	?	+	+	++
175	++	+		+/-	++	+	-	++	++
176	+	-		-	+++	+++	?	+++	++
177	+	-		-	-	-	-	+	+
178	-	-		-	-	-	-	-	-
179	+/-	-		-	-	-	-	+/-	+/-
180	+++	-		+/-	+++	+	+	++	+
181	+++	+/-		-	+++	++	-	++	++
182	+	-		-	-	-	-	+	+
183	+++	-		-	++	+	+	+++	++

Gattung: Gaffkya (Gaffk), Gram positiv

184	+	-		-	+	+	+	+	+

Fortsetzung Tabelle 1

Nr.	Trib	SFoITween Sp	Wachst	Chbl	Nilblausulfat Agar	Str	RgPr	Viktoriablau RgAg	SchrAg
Gattung: Sarcina (Sarc), Gram positiv									
185	+/-	+/-		-	-	-	-	+	++
186	+/-	-		-	-	-	-	-	-
187	+/-	-		-	-	-	-	+	+
188	+/-	-		-	-	-	-	-	+/-
189	+/-	-	1,0	-	-	-	-	-	-
190	+	-		-	-	-	-	+	?
191	+	-		-	?	-	-	+	+
192	+	-		-	-	+	-	-	+
193	++	+/-		-	++	+	-	+	+
194	+	-		-	+++	+	+	+	+
195	+/-	-		-	-	-	-	+	-
196	+	-		-	-	-	-	-	-
197	+/-	-		-	?	-	-	+/-	+
198	+/-	-		-	-	-	-	-	+/-
199	+++	-		-	+/-	-	-	+	+
200	+	-		-	-	-	-	+	-
201	+	-		-	-	-	-	-	-
202	-	-		-	-	-	-	-	-
203	+	-		-	++	-	-	-	+
204	-	-		-	-	-	-	-	-
205	+	-		-	-	-	-	+	++
Gattung: Bacillus (Bac), Gram positiv									
206	+/-	-		-	++	+	+	+	+
207	-	-		-	-	-	-	-	-
208	-	-		-	-	-	-	-	?
209	++	-		-	++	-	-	+/-	-
210	-	-		-	-	-	-	-	-
211	+++	-		-	-	+/-	-	+++	++
212	+/-	-		-	-	-	-	?	?
213	+/-	-		-	-	-	-	-	?
214	-	-	1,0	-	+	?	-	-	-

Fortsetzung Tabelle 1

Nr.	Trib	SFoI Sp	Tween Wachst	Chbl	Nilblausulfat Agar	Str	RgPr	Viktoriablau RgAg	SchrAg
215	+ -	-		-	-	-	-	+ -	+
216	+++	-		-	+ -	-	-	+	++
217	+++	+ -		-	+++	+++	+	+++	++
Escherichia Coli (E), Gram negativ									
218	++	-		-	+ -	-	-	+	+
219	-	-	0,7	-	-	-	-	-	-
220	-	-		-	-	-	-	-	-
Gattung: Lactobacillus (Lb), Gram positiv									
221	+++	+ -		-	+++	++	+	++	++
222	-	-	1,0	-	-	-	-	-	-
223	+	-		-	+	-	-	-	-
224	+ -	-		-	++	+	-	+	++
225	-	-		-	-	-	-	-	-
226	+ -	-		-	-	-	-	+	?
227	-	-		-	-	-	-	-	-
228	-	-	0,3	-	-	-	-	-	-
229	-	-		-	-	-	-	-	-
230	+ -	-		-	-	-	-	-	-
231	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-
232	-	-		-	-	-	-	-	-
233	-	-		-	-	-	-	-	-
234	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-
235	+ -	-	0,5	-	-	-	-	+	?
236	+ -	-		-	-	-	-	-	-
237	-	-		-	-	-	-	-	-
238	-	-		-	-	-	-	-	-
239	-	-		-	-	-	-	+ -	-
240	-	-		-	-	-	-	-	-
241	-	-		-	++	+	-	-	-

Fortsetzung Tabelle 1

Nr.	Trib	SFoI	Tween	Chbl	Nilblausulfat			Viktoriablau	
		Sp	Wachst		Agar	Str	RgPr	RgAg	SchrAg
Gattung: Pseudomonas (Ps), Gram negativ									
242	+++								++
243	+++								+++
Hefen (Bl)									
244	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-
245	+	-		+	++	-	-	-	+
246	+ -	-		-	-	+ -	-	+ -	?
247	+ -	-	1,0	-	+	-	-	+	+
248	++	-		-	-	-	-	-	-
249	-	-		-	-	-	-	-	-
250	+ -	-	0,1	-	-	-	-	-	-
251	+ -	-		-	-	-	-	-	+ -
252	+	-	0,1	-	-	-	-	+	+
253	-	-	0,3	-	-	-	-	-	-
254	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-
255	+ -	-		-	-	-	-	-	-
256	+	-	0,1	-	-	-	-	+ -	-
257	+	+ -		-	++	+	?	+	+
258	-	-	0,5	-	-	-	-	-	-
259	+ -	-		-	-	-	-	+ -	-
260	+	-		-	-	-	-	+	+
261	+ -	-		-	-	+ -	-	+ -	-

3.252 2 mit anderen Triglyceridzusätzen

Dem Viktoriablau-Schrägagar (3.252 1) wurden neben Tributyrin und Schweinefett folgende weitere Triglyceride zugesetzt: Tripalmitin, Tristearin, Erdnußöl, Olivenöl, Butterfett und Rindertalg.

Ergebnisse: Tripalmitin und Tristearin ließen sich nur schwer dispergieren; im übrigen vgl. Tab. 7 (s.S. 72)

Besprechung der Ergebnisse:
Tripalmitin, Tristearin und Rindertalg wurden von einem Teil der untersuchten Keime weniger angegriffen als die übrigen verwendeten Triglyceride, von denen in aufsteigender Reihenfolge Erdnußöl, Schweinefett und Tributyrin gespalten wurden.

3.26 Untersuchung zur Abhängigkeit der Fettspaltung von der Wasserstoffionenkonzentration

Ein Tributyrin-Agar (3.21) wurde auf p_H-Werte von 5,4; 6,0; 7,2; 8,0 und 8,6 eingestellt und anschließend aus Schrägagarkulturen beimpft. Die Triglyceridspaltung wurde nach dem Grad der Auflösung der Tributyrinkügelchen bestimmt.

Ergebnisse: Tab. 2 (s.S. 53)

Besprechung der Ergebnisse:
Die untersuchten Stämme zeigten, abgesehen von einem etwas verminderten Wachstum und herabgesetzter Fettspaltung auf dem Nährboden mit dem p_H-Wert 5,4, keine wesentlichen Unterschiede. Die beiden Keime der Gattung Pseudomonas, Nr. 242, 243, wiesen auf allen Nährböden gleichmäßiges Wachstum und unterschiedslose Lipolyse auf.

Tabelle 2: Abhängigkeit der Fettspaltung von der Wasserstoffionenkonzentration

Nr.	Gattg	p_H 4,5 Wa	Sp	p_H 6,0 Wa	Sp	p_H 7,2 Wa	Sp	p_H 8,0 Wa	Sp	p_H 8,6 Wa	Sp
203	Sarc	++	-	+++	-	+++	-	+++	-	+++	-
150	Micr	+(+)	±-	++	++	++	++	++	++	++	++(+)
217	Bac	++	±-	+(+)	++	++	++	++	++	++	++
160	Micr	+	±-	++	+	++	+	++	+	++	±-
175	Micr	+	-	++	+	++	+	++	+	++	+
176	Micr	+	±-	++	+	++	+	++	+	++	++
148	Micr	±-	-	++	++	++	++	++	++	++	++
206	Bac	++	-	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+
87	Staph	+	±-	++	+(+)	++	++	++	++	++	++
97	Staph	±-	-	++	+	++	+	++	+	++	+
242	Pseud	++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
243	Pseud	++	+++	++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++
139	Micr	+(+)	±-	++	+	++	+	++	+(+)	++	+(+)
124	Staph	+	-	++	++	++	++	++	++		
125	Staph	+	±-	++	++	++	++	++	++	++	++
126	Staph	++(+)	-	++	-	++	-	++	-	++	-
127	Staph	+(+)	+	++	++	++	++	++	+(+)	++	++
128	Staph	+(+)	±-	++	+(+)	++	++	++	++	++	++
129	Staph	++	+	++	++	++	++	++	++	++	++
130	Staph	++	++(+)	++	++	++	++	++(+)	++	++	++
131	Staph	±-	-	+(+)	+(+)	++	+(+)	++	++	++	++
132	Staph	+	±-	++	++	++	++	++	++	++	++(+)
133	Staph	+	±-	++	+	++	++	++	++	++	++
134	Staph	+	±-	++	++	++	++	++	++	++	++

Zeichenerklärung: Gattg: Gattung; Wa: Wachstum; Sp: Spaltung; +++ stark; ++ mittelgradig; + schwach; ( ) Zwischenstufe; ±- zweifelhaft; - negativ

3.27 Untersuchung zur Sauerstoffabhängigkeit der mikrobiellen Fettspaltung

Einem Nähragar (Standard II, Merck, p_H 7,2) wurde mit Viktoriablaubase versetztes Fett zugefügt, je 10 ml des Gemisches wurden in Reagenzgläser abgefüllt und an 3 aufeinanderfolgenden Tagen im Dampftopf sterilisiert. Das flüssige Nährsubstrat wurde bis in die Nähe des Erstarrungspunktes heruntergekühlt und mit 1 ml einer 2 Tage bei 30°C bebrüteten Bouillon beimpft. Nach kräftigem Schütteln zur Erreichung einer homogenen Emulsion wurden die Röhrchen senkrecht in Eiswasser getaucht, wodurch das Nährsubstrat ohne Entmischung erstarrte.

Während der 6-tägigen Bebrütung bei 30°C trat eine unterschiedliche Blaufärbung ein, die an der Oberfläche intensiver war und je nach Sauerstoffabhängigkeit der Keime zur Tiefe hin abnahm.

Ergebnis: Tab. 3 (s.S.55)

Besprechung der Ergebnisse:
Die Keime hatten bis auf Nr. 203 (Sarc) und 126 (Staph) nach 24 Stunden neben einer unterschiedlich intensiven Lipolyse in der Oberflächenzone der Nährbodensäule eine zumindest schwache Triglyceridspaltung bis zum Grund der Reagenzgläser bewirkt. Im Laufe der Bebrütungszeit nahmen die intensiveren Spaltungszonen von der Oberfläche ausgehend zur Tiefe hin zu. Dabei wiesen die Staphylokokken Nr. 125, 128, 131 und 134 die stärkste Fettspaltung zu allen 3 Ablesungszeitpunkten auf, während die Staphylokokken Nr. 97, 129 und 133, der Bacillus Nr. 217 sowie der Micrococcus Nr. 139 nach 24 Stunden nur mittlere Lipolyse in den oberen Schichten der Agarsäulen hervorgerufen hatten, die im weiteren Verlauf der Bebrütungszeit an Tiefe und Intensität nur unwesentlich zunahmen. Im übrigen konnte bei den Keimen eine kontinuierliche Zunahme der Lipolyse beobachtet werden.

Tabelle 3: Sauerstoffabhängigkeit der Fettspaltung

	Bebr	24 Stunden					72 Stunden					144 Stunden				
	SpStufen	a	b	c	d	e	a	b	c	d	e	a	b	c	d	e
Nr.	Gattg															
203	Sarc					-					-					-
150	Micr		3		R			3	R				3	R		
217	Bac			2	R			1	3	R			2	3	R	
160	Micr		2		R			2		R			3	4	R	
175	Micr		3		R			3	5	R			3	8	R	
176	Micr		2	5	R			3	8	R			3	8	R	
184	Micr		2	3	R			3	6	R			3	6	R	
206	Bac		2	2	R			2	4	R			3	5	R	
87	Staph		3		R			3	3	R			3	4	R	
97	Staph			2	R				2	R			3	2	R	
242	Pseud		2		R			2		R			2	3	R	
143	Pseud		2		R			2		R			2		R	
139	Micr			2	R			2	3	R			3	5	R	
124	Staph		3	5	R		6	R				6	R			
125	Staph	2	3		R		5	10	R			5	15	R		
126	Staph					-					-					-
127	Staph		2		R			3	8	R			3	10	R	
128	Staph	2	3		R		3	3	5	R		3	5	12	R	
129	Staph			2	R			2	3	R			5	R		
130	Staph															
131	Staph	3	2	R			5	R				5	R			
132	Staph		2	R			3	R				3	R			
133	Staph			2	R			2	3	R			4	R		
134	Staph	2	3	R			3	R				5	R			

Zeichenerklärung: Bebr: Bebrütungszeit in Stunden; Gattg: Gattung; SpStufen: Intensitätsstufen der Fettspaltung; a: tiefblau (sehr starke Spaltung); b: mittelblau (starke Spaltung); c: hellblau (mittlere Spaltung); d: leichter Blaustich (schwache Spaltung); e: negativ; Zahlen unter den Fettspaltungsstufen geben Fettspaltungszonen in mm von der Oberfläche an; R: Rest des Röhrchens (bis zum Boden)

3.28 Untersuchung zur Abhängigkeit der Fettspaltung vom Kochsalzgehalt des Substrats

Dem Nähragar nach RATH (250) wurde 1% Tributyrin, 0,1% Tween 80 und Kochsalz in Konzentrationen von 0,5; 1; 2; 3; 4; 6% zugesetzt. Die Keime wurden von Schrägagarkulturen überimpft. Die Auflösung der Tributyrinkügelchen wurde als Maßstab für die Fettspaltung genommen.

Ergebnisse: Tab. 4 (s.S.57)

Besprechung der Ergebnisse:
Die Keime zeigten gutes Wachstum auf allen Nährböden bis auf folgende, die bei zunehmendem Kochsalzgehalt des Nährmediums eine Wachstumsverminderung aufwiesen: Micrococcus Nr. 160 und 139, Bacillus Nr. 206 und Staphylococcus Nr. 130. In der Triglyceridspaltung wiesen die Keime mit Ausnahme von Nr. 203 (Sarc) und Nr. 126 (Staph) im wesentlichen keine bemerkenswerten Unterschiede auf. Lediglich bei den Keimen, bei denen ein herabgesetztes Wachstum festgestellt worden war, konnte gleichzeitig eine herabgesetzte lipolytische Aktivität beobachtet werden.

Tabelle 4: Kochsalzabhängigkeit der Fettspaltung und des Keimwachstums

NaCl-Konz		0,5%		1,0%		2,0%		4,0%		6,0%	
		Sp	Wa	Sp	Wa	Sp	Wa	Sp	Wa	Sp	Wa
Nr.	Gattg										
203	Sarc	-	++	-	++	-	++	-	++	-	++
150	Micr	+	++	+	++	+	++	+	+	+ -	+ -
217	Bac	+	++	+	++	+	++	+	++	-	++
160	Micr	+	++	+	++	+	++	+ -	++	-	+
175	Micr	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++
176	Micr	++	++	++	++	+	++	+	++	+	++
148	Micr	+++	++	++	++	+++	++	++	++	++	++
206	Bac	++	++	++	++	+	+	-	+ -	-	+
87	Staph	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
97	Staph	++	++	++	++	++	++	+	++	++	++
242	Pseud	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++	++	++
139	Micr	+(+)	++	+	++	+	++	+ -	+	-	+
124	Staph	++	++	+	++	+++	++	+++	++	+++	++
125	Staph	++	++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++
126	Staph	-	++	-	++	-	++	-	++	-	++
127	Staph	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
128	Staph	++	++	++	++	+++	++	+	+	+	++
129	Staph	++	++	+	++	+++	++	++	++	+	++
130	Staph	++	++	++	++	+ -	+	-	+ -	-	+
131	Staph	+	++	+	+	+	++	+	++	+	++
132	Staph	++	++	++	++	+++	++	++	++	++	++
133	Staph	++	++	+	++	+	++	+	+	+ -	++
134	Staph	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++

Zeichenerklärung: NaCl-Konz: NaCl-Konzentration des Nährbodens; Sp: Spaltung; Wa: Wachstum; Gattg: Gattung; +++ stark; ++ mittelgradig; + gering; ( ) Zwischenstufe; - negativ

3.29 Untersuchung zum Einfluß von Tween 80 auf das Wachstum der Mikroorganismen

Einem einfachen Schweinefett-Agar (Standard II, Merck, p_H 7,2) wurden 0,1; 0,3; 0,5% und 1,0% Tween 80 zugesetzt. Der Nährboden wurde in Petrischalen ausgegossen, mit Keimen aus Schrägagarkulturen überimpft, bei 30°C 3 Tage bebrütet und anschließend weitere 2 Tage unter Lichtabschluß aufbewahrt.

Ergebnisse: Tab. 1 (s.S. 43)

Besprechung der Ergebnisse:
Die meisten Wachstumshemmungen wurden bei Keimen der Gattungen Streptococcus, Staphylococcus und Lactobacillus (in absteigender Reihenfolge) und Hefen gefunden, während unter den Mikrokokken und Sarcinen nur wenige Keime durch Tween 80 im Wachstum gehemmt wurden. Bei den übrigen Gattungen können wegen der geringen Anzahl der untersuchten Keime keine entsprechenden Aussagen gemacht werden.

3.3 Chemische Untersuchungen

3.31 Isolierung freier Fettsäuren

3.311 aus Schweinefett nach Einwirkung von Reinkulturen

Eine 2 l-Nährbodenflasche wurde mit einem durchbohrten Stopfen versehen, durch den ein gebogenes Glasrohr mit einem Wattefilter führte. Nach Sterilisation der Flasche wurden 30 ml eines an 3 aufeinanderfolgenden Tagen im Dampftopf sterilisierten frischen Schweinefettes steril eingefüllt. Durch langsames Drehen der Flasche verteilte sich das Fett gleichmäßig an den Wänden und erstarrte dort zu einem dünnen Film, was durch vorsichtiges Eintauchen in ein Wasserbad von ca. 10-15°C beschleunigt werden konnte. Anschließend wurden 250 ml einer sterilen Nährbouillon eingefüllt und diese mit 5 ml einer 2 Tage bei 30°C bebrüteten Bouillon beimpft. (Testkeime: Tab. 7, s.S. 72). Die Flasche wurde auf einer Schüttelapparatur 6 Tage unter Lichtabschluß geschüttelt. Anschliessend wurde ihr Inhalt mit Petroläther extrahiert und der Gehalt an freien Fettsäuren (Säurezahl) (144) bestimmt.

Ergebnisse: Tab. 7 (s.S. 72)

Besprechung der Ergebnisse:
Der Anstieg der Säurezahlen im Schweinefett nach 6-tägiger Einwirkung von Reinkulturen war unterschiedlich. Die festgestellten Säurezahlen lagen zwischen 20,18 bei Bacillus Nr. 206 und 88, 65 bei Micrococcus Nr. 176, während die niedrige Säurezahl von 2,86 im Fett, auf das Keim Nr. 203 (Sarc) eingewirkt hatte, darauf schließen ließ, daß bei ihm keine lipolytischen Fähigkeiten vorhanden waren.

Zur Isolierung freier Fettsäuren wurden 100 ml der Fettpetrolätherlösung in einem Scheidetrichter mit jeweils 125, 100 und 75 ml einer 1/10 n Natronlauge ausgeschüttelt. Damit wurden freie Fettsäuren in wasserlösliche Seifen überführt. Die wäßrige Phase wurde dreimal mit Petroläther nachgewaschen (125, 100 und 75 ml), um Neutralfettreste gänzlich zu entfernen. Durch Zugabe von 1/10 n Schwefelsäure wurde die wäßrige Phase stark angesäuert und so die freigesetzten Fettsäuren durch dreimaliges Ausschütteln mit Petroläther (125, 100 und 75 ml) extrahiert. Nach Abdampfen des Petroläthers lagen die freien Fettsäuren vor.

3.312 aus Rohwurstfett unter Berücksichtigung von Reifung und Lagerung der Würste

Als Untersuchungsmaterial standen Rohwürste mittlerer Qualität zur Verfügung, denen mit Ausnahme einer Kontrollgruppe zur Erreichung unterschiedlicher Reifungsbedingungen neben üblichen Gewürzen und Salz Lactose bzw. Bactofermente zugesetzt worden waren. Die fertig gereiften Würste - die Reifung erfolgte für einen Teil nach dem Naturverfahren, für einen anderen Teil nach dem Schnellverfahren - waren von organoleptisch guter Beschaffenheit. Die Entnahme von Untersuchungsmaterial begann mit dem Herstellungstag und wurde in bestimmten Abständen fortgesetzt.

Um Beziehungen zwischen Wasserstoffionenkonzentration und Fettspaltung zu erfassen, wurde bei jeder Rohwurstprobe der p_H-Wert bestimmt.

Ergebnisse: Tab. 9 (s.S. 74)

Besprechung der Ergebnisse:
Die beim Rohwurstversuch II im Verlauf der Reifungszeit festgestellten p_H-Werte schwankten bei der Langsamreifung zwischen 4,7 und 6,5 und bei der Schnellreifung zwischen 4,8 und 6,4. Bei beiden Reifungsarten kam es in den Würsten zwischen dem 3. und 15. Tag zu einem Abfall der Wasserstoffionenkonzentration, während sie vom 15. bis zum 37. Tag anstieg, um dann wieder abzusinken.

Für die Gewinnung des Wurst fettes wurden die entsprechenden Proben im Wolf zerkleinert und mit Petroläther extrahiert. Nach der Extraktion wurden die Säurezahlen bestimmt (144).

Ergebnisse: Tab. 8 und 9 (s.S. 73, 74)

Besprechung der Ergebnisse:
Bei beiden Rohwurstversuchen kam es etwa bis zum 10. Tag zu einem schnellen Anstieg der Säurezahlen von 3-4 auf 10-12, während im weiteren Verlauf von Reifung und Lagerung nur noch ein allmählicher Anstieg beobachtet werden konnte. Beziehungen zur Wasserstoffionenkonzentration konnten nicht gefunden werden.

Gleichzeitig wurden bei jeder Rohwurstprobe Keimzählungen von SCHELS und HADZIHALILOVIĆ (256) unter verschiedenen Bedingungen vorgenommen+).

Für die Gewinnung der freien Fettsäuren wurde nach dem unter 3.311 beschriebenen Verfahren vorgegangen. Anschließend wurden chromatographische Trennungen durchgeführt.

+) Bestimmung der Gesamtkeimzahl (nach dem Koch'schen Plattenverfahren (257)) ohne Lactobacillen (Nährboden A), der Zahl der Faekalstreptokokken (Nährboden B), der Lactobacillen (Nährboden C) und der Gesamtkeimzahl (Nährboden E). (Hinsichtlich der Zusammensetzung der Nährböden vergl. (265)). Die ermittelten Keimzahlen sind in den Tabellen 8 und 9 (s.S. 73, 74) zum Vergleich aufgeführt.

3.32 Trennung der Fettsäuren

3.321 Papierchromatographische Trennung

Testmischungen von Fettsäuren sowie Fettsäuremischungen, die im Versuch gewonnen worden waren, wurden papierchromatographisch getrennt.

In Modifikation der von KAUFMANN und NITSCH (149) empfohlenen Methode wurde Filterpapier (Schleicher und Schüll 2043 b_H) nach Markierung der Startpunkte mit Undekan getränkt. Nach Abtropfen wurde das imprägnierte Papier zwischen sauberen Filterpapierblättern und 2 Glasplatten 10 Min. bei ca. 4 kg Belastung gepreßt. Das abgepreßte Papier wurde anschließend auf jeder Seite 5 Min. an der Luft auf sauberem Filterpapier getrocknet. Als Lösungsmittel (Fließmittel) kam eine 90%ige Essigsäure, die mit Undekan gesättigt worden war, zur Anwendung: 500 ml der 90%igen Essigsäure wurden mit 25 ml Undekan bei möglichst gleichbleibender Temperatur, die auch während der Laufzeit der Chromatogramme beibehalten wurde, ca. 15 Min. geschüttelt, wodurch eine Undekansättigung der Essigsäure eintrat. Der abgetrennten polaren Phase wurden 20 ml eines Eisessig/Wasser-Gemisches, Verhältnis 9 : 1, zugefügt, um eine geringgradige Temperaturschwankungsbreite zu berücksichtigen. Mit diesem Laufmittel betrug die Laufzeit bei 26°C für ein 30 cm langes Chromatogramm 18 Stunden. Bei 19°C wurde in der gleichen Zeit eine Chromatogrammlänge von 14-18 cm erreicht.

Nach kurzem Abtrocknen an der Luft wurden die Papierstreifen im Trockenschrank 2 Stunden auf 125°C erhitzt und dann zur Bildung von Kupferseifen 45 Min. in verdünnte Kupferacetatlösung (10 ml gesättigte Kupferacetatlösung + 240 ml Wasser) gelegt. Überflüssiges Kupferacetat wurde durch 15-minutiges Wässern entfernt; anschließend wurde das Papier in eine verdünnte Kalium-Ferrocyanidlösung (50 ml 7,5%ige wäßrige Lösung von Kalium-Ferrocyanid in 250 ml Wasser) gelegt. An den Stellen der Kupferseifen bildeten sich dunkelbraune Kupfer-Ferrocyanidflecke, während das übrige Papier sich nur hellbraun anfärbte.

Ergebnisse: Tab. 5 (s.S. 65)

Besprechung der Ergebnisse:
Papierchromatographisch (Tab. 5, PC/L 1, 2) ließen sich die Testgemische von

Fettsäuren deutlich in ihre Komponenten auftrennen, ebenso gaben die einzelnen aufgetragenen Testfettsäuren gut zu unterscheidende Retentionswerte. Allerdings stimmten diese Retentionswerte mit denen der entsprechenden Komponenten aus den Testmischungen nur annähernd überein. Es wurde beobachtet, daß die Wanderungsgeschwindigkeit einer Fettsäure je nach der aufgetragenen Konzentration in geringen Bereichen schwankte.

3.322 Dünnschichtchromatographische Trennung

Mit Hilfe dieses Verfahrens wurden ebenfalls Testgemische von Fettsäuren und im Versuch gewonnene Fettsäuregemische getrennt sowie die Retentionswerte einzeln aufgetragener Testfettsäuren zum Vergleich bestimmt.

3.322 1 Trennung auf nicht imprägnierten Platten

Es wurden Dünnschichtplatten nach den Vorschriften von STAHL (290, 291) (Ausrüstung: Desaga, Heidelberg) angefertigt. Als Adsorbens diente "Kieselgel G für die Dünnschichtchromatographie" (Merck, Darmstadt).

Als Fließmittel wurden Gemische aus Toluol/Eisessig/Wasser in den Verhältnissen 5:5:1, 5:4:2 und 5:3:2 benutzt (165). Sie wurden 10 Min. im Scheidetrichter geschüttelt und dann die Toluolphase verwendet. Die in Xylol gelösten Fettsäuren wurden mit einer Mikropipette in möglichst kleiner Fläche aufgetragen. Die Platten wurden in Chromatographiekammern gestellt. Nach 80 Min. war die Lösungsmittelfront ca. 15 cm gelaufen.

Daneben kamen andere Plattenbeschichtungen und Fließmittel zur Anwendung, deren Zusammensetzung Tab. 5 (s.S. 65) zu entnehmen ist.

Die Darstellung der Fettsäuren erfolgte durch Besprühen mit 2´ 7´-Dichlorfluorescein in 0,2%-iger äthanolischer Lösung (290). Im UV-Licht konnten hellgrünfluoreszierende Flecke auf dunkelviolettem Grund festgestellt werden. Daneben wurde Phosphormolybdänsäure zum Anfärben benutzt (145). Die im Trockenschrank bei 120°C getrockneten Platten wurden mit 10%iger äthanolischer Lösung von Phosphormolybdänsäure besprüht und anschließend im Trockenschrank

nochmals auf 120°C erhitzt, bis blaugrüne Flecke sichtbar wurden, während der Hintergrund blaßolivgrün blieb.

3.322 2 Trennung auf mit Undekan imprägnierten Platten

Die Platten wurden entsprechend 3.322 1 hergestellt und nach den Vorschriften von KAUFMANN und MAKUS (145) nach dem Trocknen vorsichtig in eine 15%-ige Lösung von Undekan in Petroläther (Sdp. 40-60°C) gelegt. Nach Ablaufenlassen des Imprägnierungsmittels wurden die zu trennenden Fettsäuren und Gemische aufgetragen und die Platten zur Entfernung des noch verbliebenen Lösungs- und Imprägnierungsmittel-Überschusses 1 Stunde bei Zimmertemperatur liegengelassen. Als Fließmittel kam ein Eisessig/Acetonitril-Gemisch 1:1 zur Anwendung, von dem 70% mit Undekan gesättigt wurden; die restlichen 30% wurden ohne Undekanzusatz hinzugegeben.

Die Platten mit den aufgetragenen Substanzen wurden in die Kammern gestellt. Nach einer Laufzeit von 80-90 Min. war die Lösungsmittelfront ca. 12-15 cm weit gelaufen. Die Anfärbung erfolgte mit Phosphormolybdänsäure (vgl. 3.3221).

Ergebnisse: Tab.5 (s.S. 65)

Besprechung der Ergebnisse:
Bei Verwendung von undekanimprägnierten Kieselgelplatten und dem Laufmittel Acetonitril/Eisessig (DC/L 3) konnte eine gute Trennung im Bereich der C-10- bis C-18-Fettsäuren erreicht werden, während die C-6- und C-8-Fettsäuren mit der Laufmittelfront gelaufen waren.

Bei den nicht imprägnierten Platten konnten auf Kieselgel mit dem Laufmittel Toluol/Eisessig/Wasser (DC/L 4,5) bei den Fettsäuren saubere Flecke erzielt werden; jedoch erschwerten die zu dicht beieinanderliegenden Retentionswerte eine genaue Differenzierung. Ähnlich verhielt es sich bei der Verwendung von Diäthyläther/Hexan-Gemischen (DC/L 6,7,8,9), wobei neben Kieselgel (DC/L 6,7,9) auch Polyamid (DC/L 8) zur Beschichtung der Platten verwendet wurde (59 a). Insbesondere bei der Trennung von Fettsäuregemischen, die im Versuch gewonnen waren, zeigte es sich, daß für die Retentionswerte 0,47 (Probe 1) und 0,48 (Probe 2) keine differenzierte Aussage gemacht werden konnte, da diesen

Retentionswerten Fettsäuren mit 8, 14 und 18:1 C-Atomen zugeordnet werden konnten, während die Zuordnung der Fettsäuren mit 12, 16 und 18 C-Atomen keine Schwierigkeiten machte.
Das Laufmittel aus Diäthyläther/Hexan/Eisessig/Acetonitril (DC/L 10) erwies sich zur Trennung als ungeeignet, da alle Komponenten mit der Lösungsmittelfront liefen, während Äthylacetat/Methanol/Acetonitril/Diäthyläther in verschiedenen Verhältnissen brauchbare Retentionswerte lieferten. Es konnte jedoch nicht erklärt werden, warum aus dem 4-Komponenten-Gemisch von Testfettsäuren in einem Falle (DC/L 15) nur Palmitin- und Stearinsäure darzustellen waren.
Bei der Verwendung von Diäthyläther/Hexan/Acetonitril (DC/L 12, 13) bereitete insbesondere die Unterscheidung von Palmitin- und Stearinsäure gewisse Schwierigkeiten, während mit Hilfe eines Laufmittels bestehend aus Pyridin/Acetonitril/Methanol/Diäthyläther ein günstiger Trenneffekt erzielt werden konnte.
Phosphormolybdänsäure und 2´,7´-Dichlorfluorescein waren als Anfärbungsmittel gleichwertig.

(Die angegebenen Retentionswerte sind keine abgesicherten Durchschnittswerte, so daß sie nur eine orientierende Übersicht geben können.)

Tabelle 5: Retentionszeiten - Papier- und Dünnschichtchromatographie

Chr	PC	PC	DC	DC	DC	DC	DC	DC
Lsgm	L 1	L 2	L 3	L 4	L 5	L 6	L 7	L 8
Fbg	KAKFC	KAKFC	PMS	DCF	DCF	PMS	PMS	PMS
TrS	PU	PU	KgGU	KgG	KgG	KgG	KgG	PA
LFr	18	14	11	13	12	13,5	15	16
Probe	t_R	t_R	t_R	t_R	t_R	t_R	t_R	t_R
Gem 1	0,67	0,84						
	0,46	0,64						
	0,54	0,41						
	0,18	0,29						
Gem 2	0,71	0,80						
	0,49	0,59						
	0,42	0,37						
	0,19	0,24						
C-6			1,0	0,66	0,69	0,44	0,47	0,64
C-8			1,0	0,65	0,69	0,46	0,52	0,64
C-10			0,9	0,63	0,67	0,48	0,55	0,69
C-12	0,71	0,83	0,78	0,61	0,63	0,38	0,49	0,59
C-14	0,49	0,52	0,72	0,61	0,63	0,45	0,59	0,65
C-16	0,31	0,36	0,55	0,52	0,53	0,25	0,29	0,64
C-18			0,45	0,50	0,51	0,23	0,21	0,30
C-18:1	0,30	0,38				0,48	0,61	0,68

Zeichenerklärung: Chr: Chromatographie-Art; PC: Papierchromatographie; DC: Dünnschichtchromatographie; Lsgm: Lösungsmittel (Fließmittel); L: Art des Lösungsmittels; Fbg: Färbung; KAKFC: Kupferacetat/Kalium-Ferrocyanid; PMS: Phosphormolybdänsäure; DCF: 2',7'-Dichlorfluorescein; TrS: Trägersubstanz; P: Papier; KgG: Kieselgel G; PA: Polyamid; U: Undekan-Imprägnierung; LFr: Retentionswert der Lösungsmittelfront in cm; t_R: relative Retentionszeit; Gem: Gemisch (Fettsäuren: C-12 bis C-18) L 1,2: 90%-ige Essigsäure; L 3: Acetonitril/Eisessig 1:1; L 4: Toluol/Eisessig/Wasser 5:5:4; L 5: Toluol/Eisessig/Wasser 5:3:3; L 6: Diäthyläther/Hexan 15:85; L 7,8: Diäthyläther/Hexan 25:75

Fortsetzung Tabelle 5

Chr	DC	DC	DC	DC	DC	DC	DC
Lsgm	L 9	L 10	L 11	L 12	L 13	L 14	L 15
Fbg	PMS	PMS	PMS	PMS	PMS	PMS	PMS
TrS	KgG	KgG	KgG	KgG	KgG	KgG	KgG
LFr	15	15	13	15	14,5	14	13,5
Probe	t_R	t_R	t_R	t_R	t_R	t_R	t_R
Gem 1						0,72	0,33
						0,54	0,27
						0,49	
						0,35	
Gem 2						0,73	
						0,54	
						0,44	
						0,37	
C-6	0,42	1,0	0,92			0,73	0,85
C-8	0,47	1,0	0,78			0,66	0,76
C-10	0,49	1,0	0,89			0,66	0,64
C-12	0,45	1,0	0,75				
C-14	0,47	1,0	0,71	0,57	0,64	0,53	
C-16	0,27	1,0	0,67	0,33	0,38	0,45	0,35
C-18	0,21	1,0	0,62	0,32	0,34	0,34	0,27
C-18:1	0,46	1,0	0,86	0,73	0,61	0,70	0,75
Probe 1	0,47						
	0,43						
	0,29						
	0,22						
Probe 2	0,48						
	0,41						
	0,29						
	0,23						

Zeichenerklärung: L 9: Diäthyläther/Hexan 20:80; L 10: Diäthyläther/Hexan/Eisessig/Acetonitril 2:3:2:2; L 11,15: Äthylacetat/Methanol/Acetonitril/Diäthyläther 2:2:1:1; L 12,13: Diäthyläther/Hexan/Acetonitril 20:75:5; L 14: Pyridin/Acetonitril/Methanol/Diäthyläther 50:30:50:25
Probe 1 und 2: aus Rohwurstfett isolierte freie Fettsäuren

3.323 Gaschromatographische Trennung

3.323 1 Methylveresterung

Um günstige Voraussetzungen für die gaschromatographische Trennung der Fettsäuren zu schaffen, wurden die freien Säuren nach der Methode von METCALFE und SCHMITZ (204) mit Methanol und einem Bortrifluoridzusatz verestert (vgl. auch die Arbeitsvorschriften von NIESAR (221, 222)). Zu diesem Zweck wurde 2 Teilen Methanol in einem hochwandigen Gefäß (zur Vermeidung des Überschäumens) 1 Teil Bortrifluorid+) in Form des Ätherats zugesetzt. Die Arbeiten wurden im Abzug ausgeführt. Von diesem Gemisch wurden jeweils 20 ml zu 1 g des zu veresternden Fettsäuregemisches zugesetzt. Nach 3-minutigem Kochen bei 70-80°C wurden mittels eines Scheidetrichters die Methylester mit Petroläther ausgeschüttelt. Die Petroläther-Fettsäuremethylester-Lösung wurde dann 2-3 mal mit destilliertem Wasser gewaschen bis das Waschwasser neutral war. Zur völligen Entfernung von Wasserrückständen wurde die Petrolätherphase mit wasserfreiem Natriumsulfat versetzt und 8 Stunden stehenlassen. Nach dem Abdestillieren wurden die Fettsäuremethylester entweder direkt oder nach erneuter Lösung in Petroläther zur gaschromatographischen Trennung verwendet. Die Aufbewahrung erfolgte im Kühlschrank.

3.323 2 Trennung

Gaschromatographisch getrennt wurden Testmischungen sowie im Versuch gewonnene Fettsäuremischungen, daneben wurden zum Vergleich Testsubstanzen+) chromatographiert. Die Untersuchungen wurden mit einem Gerät der Fa. Bodenseewerk Perkin-Elmer & Co. GmbH, Überlingen/Bodensee, Typ Fraktometer F 6, und vergleichsweise mit einem Gerät der Fa. F & M Scientific Corporation,

---

+) Freundlicherweise wurden mir Bortrifluorid von der Badischen Anilin- & Soda-Fabrik AG, Ludwigshafen/Rhein, sowie Testsubstanzen und -gemische von Fettsäuremethylestern von Herrn Dr. G. Raupp, Perkin-Elmer & Co. GmbH, Ingenieurbüro Frankfurt/M., zur Verfügung gestellt.

Avondale Pennsylvania/ USA, Modell 810 +) durchgeführt, das über einen mit dem Gerät verbundenen Schreiber verfügte, während die mit dem Fraktometer F 6 erzielten Ergebnisse mit einem Sargent Recorder SR (bezogen über Bodenseewerk Perkin-Elmer & Co. GmbH) aufgezeichnet wurden.

Als Säulenmaterial wurden verwendet:
bei dem Fraktometer F 6 (Perkin-Elmer):
EGS = Äthylenglykolsuccinat auf Chromosorb W, silan. 80/100
AM = Apiezonfett M auf Celite, 60/100
SE 30 = Silikongummi SE 30 auf Chromosorb W, silan. 80/100;

bei dem Modell 810 (F & M Scientific):
Silicone Gum Rubber SE 30.

Die Substanzen wurden mit einer Mikroliterspritze mit einem Fassungsvermögen von 10 Mikrolitern (Hamilton, Nr. 701; bezogen über Bodenseewerk Perkin-Elmer & Co. GmbH) eingespritzt.

Ergebnisse: Tab. 6 (s. S. 70)

Besprechung der Ergebnisse:
Mit den 3 verwendeten Säulentypen konnten bei geeigneten Säulentemperaturen im wesentlichen günstige Trenneffekte erzielt werden. Eine deutliche Trennung von Stearin- und Ölsäure ließ sich jedoch nur mit Hilfe der EGS-Säule erreichen.

Die im Versuch (3.311, 3.312) gewonnenen und veresterten Fettsäuremischungen wurden mit der EGS-Säule bei 190 °C Säulentemperatur einer Strömungsgeschwindigkeit des Trägergases von 44 ml/min, einem Trägergasdruck von 2 atü und einem Papiervorschub des Schreibers von 1 cm/min getrennt. Die übrigen Arbeitsbedingungen sind Tab. 6 (s. S. 70) zu entnehmen.

Die Peakflächen der Säuren mit 16 und 18 C-Atomen - in C-18 sind Ölsäure und Stearinsäure enthalten - wurden als Produkt aus Halbwertsbreite und Peakhöhe ermittelt und das C-16/C-18, C-18:1-Verhältnis errechnet. Ester von Fettsäuren mit weniger als 12 und mehr als 18 C-Atomen wurden nicht berücksichtigt.

+) An dem Gerät wurde im Institut für Organische Chemie der Technischen Hochschule Braunschweig (Dir. Prof. Dr. H. Inhoffen) unter Herrn Dipl.-Chem. H. Krösche gearbeitet.

Ergebnisse: Tab. 7, 8, 9 (s. S. 72, 73, 74)

Besprechung der Ergebnisse:
Die C-16/C-18, C-18:1-Verhältnisse bei den Fettsäuregemischen, die aus Fetten gewonnen wurden, auf die Reinkulturen von Keimen eingewirkt hatten (3.31), schwankten zwischen 2,12 und 3,07, während diejenigen für Rohwurstfett zwischen 2,09 und 3,81 differierten.
Beziehungen der Verhältniswerte zu den entsprechenden Säurezahlen konnten nicht gefunden werden. Das Gleiche gilt für Beziehungen zu den Ergebnissen bei der Untersuchung verschiedener Triglyceridzusätze (3.252 2). Auch hinsichtlich der bei den Rohwurstuntersuchungen festgestellten Wasserstoffionenkonzentrationen konnten keine Beziehungen aufgestellt werden.

Tabelle 6: Säulenvergleich (Retentionszeiten) Gaschromatographie
(bei Variation der Arbeitsbedingungen)

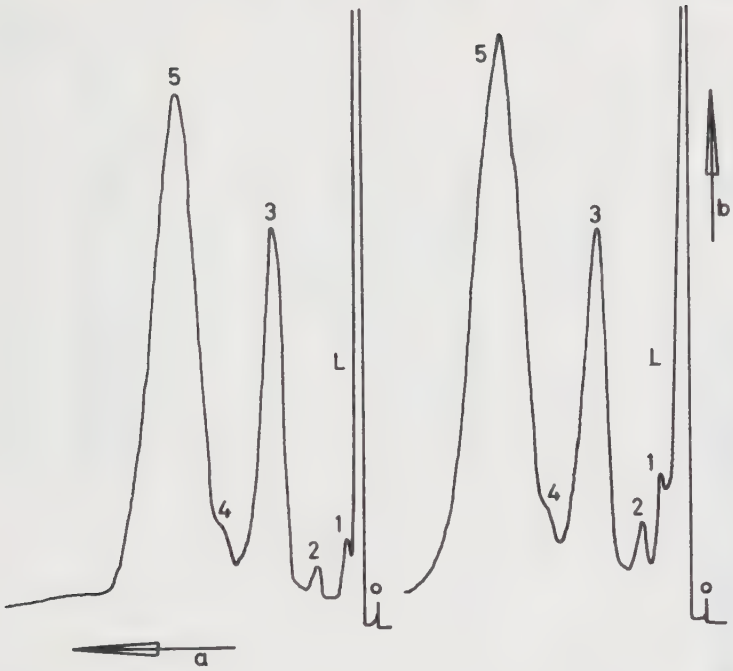
Säule		Temp	Strg	Druck	V	C-10	C-12	C-14	C-16	C-18	C-18:1
F&M	a					3,9	4,7	5,7	6,7	7,8	
	r					1,0	1,2	1,4	1,71	2,0	
EGS	a	210	32	2,05	1	0,2	0,5	0,7	1,3	2,4	2,9
	r					1,0	2,5	3,5	6,5	12,0	14,5
EGS	a	200	40	2,0	1	0,6	0,9	1,8	3,35	5,7	
	r					1,0	1,5	3,0	5,58	9,5	
EGS	a	180	38	2,05	1	0,9	1,6	3,2	6,4	12,9	
	r					1,0	1,78	3,6	7,11	14,33	
AM	a	250	64	2,0	1	2,6	5,4	11,1	22,3	44,8	
	r					1,0	2,07	4,27	8,57	17,23	
AM	a	300	48	2,1	1	0,8	1,9	2,5	4,6	8,2	7,6
	r					1,0	2,37	3,12	5,75	10,2	9,5
EGS	a	190	44	2,0	1	0,9	1,5	2,2	3,9	6,0	7,4
	r					1,0	1,67	2,4	4,3	6,7	8,2

Trägergas: Helium
Detektor: Hitzdraht
Temperatur: Einspritzblock: 350°C, Auslaßteil: 350°C, Detektor: 350°C

Zeichenerklärung: Temp: Temperatur; Strg: Strömung des Trägergases (ml/min); Druck in atü; V: Papiervorschub (cm/min); a: absolute Retentionszeit; r: relative Retentionszeit (bezogen auf C-10);

F&M: Silikon Gummi SE 30;
EGS: Äthylenglykolsuccinat auf Chromosorb W, silan. 80/100;
AM Apiezonfett M auf Celite 545, 60/100

Abb. 1: Gaschromatogramme



Bacillus (Nr. 217) RV II, Probe 3 NL

Säule: EGS

Temp.: 190°C

weitere Arbeitsbedingungen: Tab. 6 (s.S. 70)

Zeichenerklärung

b	:	Schreiberausschlag
a	:	Retentionszeit
L	:	Lösungsmittel
o	:	Startpunkt
1	:	C 12
2	:	C 14
3	:	C 16
4	:	C 18
5	:	C 18:1

Tabelle 7: Triglyceridspaltung, Säurezahl und C-16/C-18-Verhältnis bei Reinkulturen

Nr.	Gattg	Tbt	Tpl	Tst	Olv	Erd	But	Swf	Tlg	SZ	C-16/18
AK	1									1,57	2,53
SK	1									1,71	2,63
203	Sarc	-	-	-	-	-	-	-	-	2,68	2,12
150	Micr	+++	++	+	++	++		++	++	36,03	2,68
217	Bac	+++	+	+ -	+	+ -	++	++	+ -	40,7	3,07
160	Micr	++	+(+)	+	++	+	++	++	+	23,05	2,37
175	Micr	++	+	+	++(+)	++	++	++	+	27,58	2,35
AK	2									1,60	2,69
SK	2									1,84	2,23
176	Micr	++	+	+	++	++	++	++	++	88,65	2,65
148	Micr	+++	++	+	++	++	++	++	+	26,36	2,28
206	Bac	+	-	-	+ -	+ -	+	+	-	20,18	2,79
87	Staph	+	++	+	++			+	++	59,31	2,40
97	Staph	++	++	+	++	++	++	++	+	47,69	2,88
242	Pseud	+++	++	++	++	++	++	++	++		
243	Pseud	+++	++		++	++	++	++	++		
139	Micr	+++	++	+	+	-	++	++	+		
124	Staph	++	++	+	++	++	++		+ -		
125	Staph	+++	++		++						
127	Staph	+++	+	+	+	+ -	+	++	+		
128	Staph	+++	+	+	++	+	++	++	+ -		
129	Staph	+	+ -	+ -	+	+	+	+	-		
130	Staph	++	+ -	-	+	-	+	+ -	-		
131	Staph	+++	++		++	++	++(+)	++	++		
132	Staph	++	++	++	++	+	++	++	++		
133	Staph	++		+		++	++	++	+		
134	Staph	++	++	++	++	++	++	++	+		

Zeichenerklärung: Tbt: Tributyrin; Tpl: Tripalmitin; Tst: Tristearin; Olv: Olivenöl; Erd: Erdnußöl; But: Butterfett; Swf: Schweinefett; Tlg: Rindertalg; SZ: Säurezahl; C-16/18: Verhältnis der Fettsäuren mit 16 und 18 C-Atomen (C-18 enthält Stearinsäure (C-18) und Ölsäure (C-18:1)); AK: Ausgangskontrolle; SK: Schüttelkontrolle; +++: stark; ++: mittelgradig; +: schwach; ( ): Zwischenstufe; +-: zweifelhaft; -: negativ

Tabelle 8: Keimzahlen (pro g Rohwurstmasse), Wasserstoffionenkonzentration, Säurezahl und das Verhältnis der Fettsäuren mit 16 und 18 C-Atomen während der Rohwurstreifung

RV	Tg	Pr	NB A	Nb B	Nb C	Nb E	p_H	SZ	C-16/18
I	o	A						4,90	2,36
	5	NL	uz	uz	uz	uz			
		NR	uz	uz	uz	uz		7,10	2,09
		ZL						7,84	2,41
		ZB						8,06	2,15
	8	NL	$1,6x10^9$	$5,7x10^3$	$3,3x10^7$	$3,8x10^7$			
		NR	$5,5x10^8$	$2,2x10^4$	$2,2x10^8$	$2,6x10^8$		10,3	2,32
		ZL						10,04	2,37
		ZB						11,14	
	25	NL	$1,8x10^7$		$9,1x10^7$	$2,2x10^8$			
		NR	uz	uz	$2,6x10^8$	uz		11,27	2,39
		ZL						11,28	2,63
		ZB						11,95	2,58
	40	NL							2,58
		NR						11,73	2,09
		ZL						12,37	2,38
		ZB						13,14	2,50

Zeichenerklärung: RV: Rohwurstversuch; Tg: Reifungsdauer in Tagen; Pr: Probe; Nb: Nährboden; A, B, C, E: Zusammensetzung der Nährböden (vgl. 265); SZ: Säurezahl; C-16/18: Verhältnis der Fettsäuren mit 16 und 18 C-Atomen (C-18 enthält Stearinsäure (C-18) und Ölsäure (C-18:1)); A: Ausgangswurstmasse ohne Zusätze; NL: Normalzusammensetzung, langsam gereift; NR: Normalzusammensetzung, schnell gereift; ZL: mit Laktosezusatz; ZB: mit Baktofermentezusatz; uz: unzählbar

Tabelle 9: Keimzahlen (pro g Rohwurstmasse), Wasserstoffionenkonzentration, Säurezahl und das Verhältnis der Fettsäuren mit 16 und 18 C-Atomen während der Rohwurstreifung

RV	Tg	Pr	Nb A	Nb B	Nb C	Nb E	p_H	SZ	C-16/18
II	o	A	$3,1x10^7$	$5,2x10^3$	$3,0x10^7$	$2,7x10^7$		3,34	2,75
	3	NL	$3,1x10^8$	$3,7x10^3$			5,6	8,48	3,28
		NR	$2,7x10^8$	$3,7x10^3$	$2,2x10^8$	$2,6x10^8$	5,5	9,38	2,79
	8	NL	$2,8x10^8$	$1,1x10^3$	$2,5x10^8$	$3,1x10^8$		9,64	3,23
		NR	$3,0x10^8$	$1,6x10^3$	$3,5x10^8$	$4,1x10^8$		10,15	3,11
	15	NL	$3,4x10^8$	d	$2,4x10^8$	$2,6x10^8$	4,7	11,39	
		NR	$2,9x10^8$	d	$2,1x10^8$	$2,3x10^8$	4,8	11,29	
	22	NL	$6,9x10^{10}$	d	$5,1x10^9$	$4,2x10^9$	5,5	11,57	2,67
		NR	$1,2x10^{11}$	d	$3,1x10^9$	$3,4x10^9$	5,5	11,59	3,81
	37	NL	$4,2x10^7$	d	$6,2x10^7$	$6,5x10^7$	6,5	12,44	2,77
		NR	$1,7x10^7$	d		$2,5x10^7$	6,4	12,61	3,66
	50	NL	$2,8x10^7$	d	$4,3x10^7$	$4,4x10^7$	5,8	12,63	3,61
		NR	$2,3x10^7$	d	$2,7x10^7$	$3,0x10^7$	5,4	13,85	2,72

Zeichenerklärung: RV: Rohwurstversuch; Tg: Reifungsdauer in Tagen; Pr: Probe; Nb: Nährboden; A, B, C, E: Zusammensetzung der Nährböden (vgl. 265); SZ: Säurezahl; C-16/18: Verhältnis der Fettsäuren mit 16 und 18 C-Atomen (C-18 enthält Stearinsäure (C-18) und Ölsäure (C-18:1)); A: Ausgangswurstmasse ohne Zusätze; NL: Normalzusammensetzung, langsam gereift; NR: Normalzusammensetzung, schnell gereift; ZL: mit Laktosezusatz; ZB: mit Baktofermentezusatz; uz: unzählbar; d: durchschnittlich

3.324 Infrarotspektrophotometrie

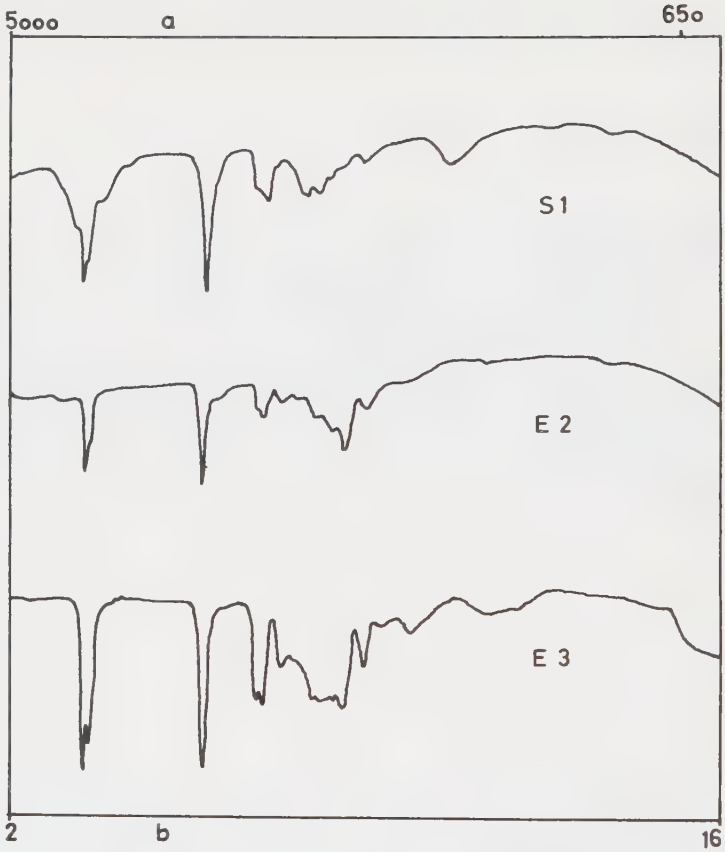
Mit einem Beckman Infrarotspektrophotometer, Typ IR 5A +) wurden freie Fettsäuren und Ester untersucht.

Ergebnisse: Abb. 2 (s.S. 76)

Besprechung der Ergebnisse:
Die Fettsäuren waren nicht voneinander zu unterscheiden, ebenso verhielt es sich mit ihren Methylestern. Dagegen konnten die Ester von den Säuren deutlich unterschieden werden, was am Beispiel Caprylsäure - Caprylsäuremethylester gezeigt werden konnte. Infolge Wegfalls der OH-Schwingungen bei Wellenlänge 3,25 und 3,7 micron, einer Verschiebung der C=O-Schwingungen von 5,85 auf 5,75 micron und des Auftretens der charakteristischen OCH_3-Schwingunggen bei 8,3 bis 8,7 micron, ließ sich der Ester von der Säure leicht unterscheiden.

+) An dem Gerät wurde im Institut für Organische Chemie der Technischen Hochschule Braunschweig (Dir. Prof. Dr. H. Inhoffen) unter Herrn Dipl.-Chem. H. Krösche gearbeitet.

Abb. 2: Infrarotspektrogramme



Zeichenerklärung:

a - Skala : Wellenlänge in cm^{-1}
b - Skala : Wellenlänge in Mikron
S1 : C 8 Säure
E2: C 8 Ester
E3: C 12 Ester

4 DISKUSSION

In den Untersuchungen sollten histologische, biologische und chemische Methoden für den Nachweis der mikrobiellen Fettspaltung einem kritischen Vergleich unterzogen werden.

4.1 Lokalisation der mikrobiellen Fettspaltung in Lebensmitteln mit histologischen Methoden

Histologische Methoden sollten auf ihre Eignung geprüft werden, den örtlichen Angriffspunkt von Mikroorganismen auf Fettpartikel in Lebensmitteln, insbesondere in Rohwürsten darzustellen.

Der Nachweis der Kristalle im polarisierten Licht ergibt gute Übersichtsbilder.

Anhaltspunkte für die Zuordnung der Lipide oder sich als solche darstellender Gebilde bietet die Morphologie. So weisen nadelförmige Kristalle bei der Untersuchung im polarisierten Licht auf freie Fettsäuren hin. Im übrigen können in Zweifelsfällen die von FISCHLER (65) und ROMEIS (258) vorgeschlagenen Unterscheidungsmethoden weiterhelfen.

Als ebenfalls geeignet zum Nachweis freier Fettsäuren hat sich die Nilblausulfatfärbung erwiesen, die ebenfalls brauchbare Übersichtsbilder ergibt. Wenn HENNEBERG (91) jedoch aus den unterschiedlichen Veränderungen von Fettpartikeln (insbesondere bei Fetttröpfchen aus der Milch) auf die Verschiedenheit der Struktur und der Fettmischung schließen will, so ist das insofern problematisch, als die Veränderungen morphologisch so unterschiedlich sein können, daß sie nur schwer einer Systematisierung zugänglich sein dürften. Schließlich muß auch berücksichtigt werden, daß es keine spezifische Fettsäurenfärbung gibt (284), die eine quantitative histochemische Auswertung erlauben würde. Zwar vertritt VODOVAR (316 a) die Ansicht, daß insbesondere die Nilblausulfatmethode eine Spezifität aufweise, eine ausreichende Begründung blieb er jedoch schuldig, während VASTESAEGER und DELCOURT (313 a) einräumen, daß einzelne Lipide (wie Fettsäuren und Cholesterin) nicht eindeutig differenziert werden können.

Eine bedingt quantitative Aussage läßt sich jedoch über den Grad des Fettabbaus machen. So waren Fettpartikel aus frischem Schweinefettgewebe praktisch nicht angegriffen, während die aus Rohwürsten entnommenen Fettstückchen eine, je nach dem Reifezustand unterschiedlich starke Fettsäurebildung zeigten.

Nicht außer acht gelassen werden darf jedoch bei der Auswertung histologischer Ergebnisse, daß zwischen der Ursache der hydrolytischen Spaltung - durch Gewebsfermente oder durch bakterielle Fermente - nicht unterschieden werden kann. Hier kann vielleicht die von BÜRGER (32) empfohlene kombinierte Fett- und Bakterienfärbung weiterhelfen. Genauere Studien über die Vorgänge der hydrolytischen Spaltung an der Fettzelle bzw. an den Grenzen der Fettpartikel werden nur mit histotopochemischen Methoden gewonnen werden können.

4.2 Nachweis der lipolytischen Aktivität bei Mikroorganismen mit biologischen Methoden

4.21 Vergleich der Methoden

Vergleicht man die verwendeten Nährböden nach ihrem Ergebnis, so zeigt sich, daß mittels Tributyrin die meisten positiven Reaktionen nachgewiesen wurden, dann folgten Viktoriablau und Nilblausulfat in ihren verschiedenen Modifikationen, während die Verwendung von Schweinefett ohne Indikatorzusatz (entsprechend der Tributyrinmethode) unbefriedigende Ergebnisse erbrachte. Die Aussagekraft des Chinablau-Nährbodens war so gering, daß er außerhalb der Diskussion bleiben kann.

4.211 ohne Indikator

Während die Tributyrinmethode sogar eine halbquantitative Auswertung ermöglichte, konnten mit Schweinefett, das wie Tributyrin (unter Zusatz von Tween 80 als Emulgator) verwendet wurde, kaum qualitative Ergebnisse erzielt werden, was sich auch durch eine mengenmäßige Variation des Fett- und Indikatorzusatzes nicht ändern ließ.

Die Nährböden mit Indikatorzusatz zeigten zwar weniger Fettspalter an als der Tributyrin-Nährboden, ließen jedoch gleichzeitig erkennen, daß die überwiegend negativen Resultate des Nährbodens mit dispergiertem Schweinefett ohne Indikatorzusatz kein Maßstab für die tatsächliche Fettspaltung sind.

4.212 mit Indikator

4.212 1 Nilblausulfat

Die Agarplattenmethode mit Nilblausulfat-Fettzusatz zeigte im wesentlichen klare Ergebnisse. Ebenfalls klare Ergebnisse ließen sich mit dem Streifentest und der Ringprobe erreichen. Bei den beiden letzten Proben ist es wichtig, die beimpfte Nährbouillon zuvor 2 Tage bei 30°C zu bebrüten, um eine genügende Keimkonzentration zu erreichen. Werden diese Proben gleichzeitig mit dem Beimpfen angesetzt, so ergeben sich unklare Ergebnisse.

Sowohl beim Streifentest als auch bei der Ringprobe sind etwas weniger positive Ergebnisse zu erreichen als bei der Verwendung von Agarplatten. Darüber hinaus erfordert das Ablesen der Ringprobe eine besondere Sorgfalt, da der blaue Ring immer sehr fein und nicht gleichmäßig an der gesamten Unterfläche des Fettpfropfens verteilt ist. Der verwendete Indikator ist als das Sulfat des Diäthylaminophenonaphtoxazins anzusehen, bei dem Oxazin- und Oxazonform im Gleichgewicht stehen (325, 46).

Wenn die Darstellungen von SMITH (281), THORPE (309) und EISENBERG (60) so aufzufassen sind, daß in ihnen die Möglichkeit angedeutet ist, wonach das bessere Dissoziierungsvermögen des Oxazons bei der Lösung in Fett oder Fettlösungsmittel von Bedeutung sein könnte, so stehen dem die Ergebnisse eigener Untersuchungen entgegen: Bei der "kalten" Färbung von Fett mit der Base des Nilblausulfats läßt sich im wasserfreien Milieu die Nilblaubase in Substanz in Petroläther lösen. Anschließend kann, wie die Versuche gezeigt haben, in dem gefärbten Petroläther das zu färbende Fett gelöst und nach Abdampfen des Lösungsmittels als rot gefärbt erhalten werden.

Die Herstellung des Nilblaufettes im wäßrigen Milieu, wie sie üblicherweise durchgeführt wird (55, 304, 325), verbindet lediglich den Vorgang der Überführung des Nilblausulfats in seine Base mit der Anfärbung des Fettes. Daß hierbei

für die Fettfärbung Dissoziierungsvorgänge notwendig sind, ist unwahrscheinlich, da einmal das Reaktionsschema keinen Anhaltspunkt dafür gibt und zum anderen eine Nilblau-Fettfärbung auch im wasserfreien Milieu möglich ist.

Jeder Indikatorzusatz hat eine Wirkung auf das Wachstum der Mikroorganismen bzw. auf ihre lipolytische Aktivität (55, 250). Bei der Papierstreifen- und der Ringmethode werden zumindest mögliche wachstumsbeeinflussende Faktoren des Nilblausulfats ausgeschaltet. Die größere Zahl von positiven Ergebnissen bei der Agarplattenmethode gegenüber dem Papierstreifentest und der Ringprobe zeigt jedoch, daß die Wachstumsbeeinflussung durch das Nilblausulfat, wenn es dem Agar zugesetzt wird, nicht so groß ist, daß die Methode dadurch den beiden anderen Proben unterlegen wäre, bei denen der Indikator mit den Mikroorganismen erst nach zweitägiger Bebrütung in Berührung kommt. Letztere sind als einfache Übersichtsprüfungen geeignet, wenn Keime als Bouillonkulturen bereits vorliegen.

4.212 2 Viktoriablau

Ringagar und Schrägagar geben, wie die Versuche gezeigt haben, gleichgute Ergebnisse, so daß es sich erübrigt, die komplizierte Ringagarmethode zu verwenden, die bei Reihenuntersuchungen nicht nur sehr arbeitsaufwendig, sondern auch - wegen der Glasringe - kostspielig ist. Der Verzicht auf eine dünne Nähragarschicht, die von RATH (250) als günstige Voraussetzung für eine gleichmässige Diffusion der Lipasen zum Differenzierungsmedium angesehen wird, hat sich nicht als nachteilig erwiesen. Das mag darauf zurückzuführen sein, daß der Farbumschlag im Differenzierungsmedium (neben noch vorhandenen Lipasen) besonders auf den Fettsäuren beruhen könnte, die aus dem im Nährmedium dispergierten Fett durch Lipasewirkung freigesetzt werden. (Für die Zählung lipolytischer Keime sollte jedoch aus Gründen der größeren Übersichtlichkeit - insbesondere bei geringen Keimkonzentrationen - die Methode nach RATH (250) verwendet werden.)

Durch den nachträglichen Zusatz des Differenzierungssubstrates ist die Möglichkeit der Keimhemmung weitgehend ausgeschaltet (250).

4.22 Bedeutung direkter und indirekter Nachweise

Vergleicht man die Nilblausulfat- mit der Viktoriablau-Technik, dann ist zunächst davon auszugehen, daß in beiden Fällen ein Indikator vorliegt, dessen Differenzierungsvermögen von der Änderung des Wasserstoffionenpotentials abhängig ist. Zwar sprechen TURNER (311) und EISENBERG (60) gerade bei der Nilblausulfat-Methode von einem spezifischen Nachweis für Fettsäuren. Das Reaktionsschema bei Nilblausulfat und bei Viktoriablau zeigt jedoch, daß es sich um p_H-Indikatoren handelt. Diese Auffassung wird insbesondere von DEMETER (54) sowie CASTELL und BRYANT (41) unterstützt.

Da beim Einwirken von Mikroorganismen auf Fette in Nährböden die Änderung des p_H-Wertes jedoch überwiegend von den freiwerdenden Fettsäuren beeinflußt werden dürfte, lassen sich p_H-Indikatoren wie Nilblau und Viktoriablau zum Nachweis mikrobieller Fettspaltung verwenden. Dafür spricht sowohl der chemische Nachweis einer starken Fettspaltung durch Reinkulturen als auch die weitgehende Übereinstimmung der Tributyrin-, Nilblausulfat- und Viktoriablaumethode.

Zu berücksichtigen wäre auch, daß Methoden mit diesen Indikatoren in ihrer Empfindlichkeit mit zunehmender Kettenlänge der Fettsäuren abnehmen, da mit der Zunahme der Kettenlänge die Wirkung des Hydroxylions zurückgeht. +) Wie die Versuche zeigten, fällt das jedoch für die praktische Anwendbarkeit nicht weiter ins Gewicht.

Fehlresultate können auch durch p_H-Wert-Änderungen hervorgerufen werden, die nicht auf dem Freiwerden von Fettsäuren beruhen. Insbesondere kommt hier die Milchsäurebildung in Frage. CORETTI (48) hat jedoch bei Laktobazillen die Auswirkung der Säurebildung, die nicht mit der Fettspaltung zusammenhängt, als unerheblich - zumindest für die Wirksamkeit der Tributyrinmethode - dargestellt. Dieses Ergebnis kann auch für die Indikatornährböden mit herangezogen werden.

Bei der Gegenüberstellung von Nährböden mit und ohne Indikator haben die Methoden ohne Indikatorzusatz den Vorteil einer geringeren Beeinflußbarkeit durch

---

+) Ein einfacher Versuch zeigte, daß gleiche Mengen von Fettsäuren verschiedener C-Atom-Zahlen mit gleichen Mengen von in Petroläther gelöster Nilblau- oder Viktoriablaubase eine mit Zunahme der C-Atom-Zahl weniger intensive Blaufärbung aufwiesen.

Indikatorfehler. Es handelt sich um einen direkten Nachweis der Auflösung von Triglyceridkügelchen. Der praktischen Brauchbarkeit des direkten Nachweises sind durch die Emulgierbarkeit der Triglyceride Grenzen gesetzt. Lediglich bei niederen Triglyceriden, wie Tributyrin, die hinreichend fein im Nährmedium dispergiert werden können, läßt sich durch die zu untersuchenden Mikroorganismen eine so starke Hydrolyse erreichen, daß die Triglyceridkügelchen völlig aufgelöst werden. Die Gefahr von Fehlresultaten durch Spontanhydrolyse des Tributyrins bei Erniedrigung des p_H-Wertes scheint unbeachtlich zu sein. Dafür sprechen insbesondere die Untersuchungen von CORETTI (48), der für Laktobazillen, bei denen eine gegenüber anderen Mikroorganismen stärkere Ansäuerung des Nährbodens auftreten kann, diese Möglichkeit weitgehend als die Hydrolyse beeinflussenden Faktor ausschließen konnte. +)

Eine mikrobielle Fettspaltung höherer Triglyceride läßt sich auf direktem Wege nicht zufriedenstellend nachweisen. Das gilt nach MOIR und RUSSEL (206) für im Nährböden dispergiertes Butterfett. Ebenso konnte CORETTI (48) mit dispergiertem Schweinefett weniger überzeugende Ergebnisse erzielen als mit Tributyrin. Nicht befriedigen konnten auch die eigenen Untersuchungen mit dispergiertem Schweinefett. Der Nachweis mikrobiell bedingter hydrolytischer Fettspaltung (bei höheren Fetten) läßt sich hinreichend nur indirekt, d.h. unter Verwendung von Indikatoren führen.

Nilblausulfat- und Viktoriablaumethode sind im wesentlichen gleichwertig, wie die Untersuchungen gezeigt haben, wenn auch die Viktoriablaumethode etwas empfindlicher zu sein scheint.

+) Folgende Beobachtung mag zur Klärung des Säureeinflusses beitragen: Nach Auftropfen von Milchsäure auf einen unbeimpften Tributyrin-Nährboden konnte in den ersten Stunden keine Hydrolyse festgestellt werden. Erst bei 24-stündiger Aufbewahrung bei 37°C waren schwache Anzeichen einer hydrolytischen Spaltung festzustellen, während nach 48 Std. in weiten Bereichen des Nährbodens die Tributyrinkügelchen aufgelöst waren. Daraus folgt, daß erst bei sehr hohen Milchsäurekonzentrationen, wie sie unter Bakterieneinfluß praktisch nicht auftreten dürften, und unter günstigen Bedingungen (37°C) das Tributyrin hydrolysiert wird. Immerhin muß die Möglichkeit der Spontanhydrolyse - insbesondere bei Milchsäurebildnern - als störender Faktor beachtet werden.

Zur Vermeidung von Fehlresultaten durch Änderungen der Wasserstoffionenkonzentration, bedingt durch andere Faktoren als die hydrolytische Fettspaltung, sollten die indirekten Methoden jeweils mit der direkten Tributyrinmethode gekoppelt werden.

Bei Verwendung höherer Triglyceride muß somit eine positive Reaktion nach der indirekten Methode angezweifelt werden, wenn nicht gleichzeitig eine Tributyrinspaltung direkt nachgewiesen werden kann. (Das gilt, nach den obigen Ausführungen, nicht für die Verwendung des niederen Tributyrins bei der indirekten Methode, da in diesem Falle bereits eine auch nur teilweise Spaltung, die noch nicht zur restlosen Auflösung der Tributyrinkügelchen geführt hat, mittels Indikatoren nachgewiesen werden kann.)

4.3 Substratspezifität lipolytischer Mikroorganismen

4.31 Allgemeines (unter Berücksichtigung biologischer Nachweis-Methoden)

Die unterschiedliche Spaltung verschiedener Triglyceride durch Mikroorganismen, wie sie - um die wesentlichsten Autoren zu nennen - von v. MALLINCKRODT-HAUPT (191), COLLINS und HAMMER (46), NELSON (218, 213), TERPLAN (303) festgestellt wurde, zeigt, daß tributyrinspaltende Mikroorganismen nicht unbedingt in der Lage sein müssen, auch höhere Triglyceride zu spalten. Diese Auffassung wird durch eigene Untersuchungen bestätigt.

Der Grund für dieses unterschiedliche Fettspaltungsvermögen ist in einer Substratspezifität der lipolytischen Mikroorganismen bzw. ihrer Lipasen zu sehen. Eine absolute Substratspezifität (105 a), d.h. die Spaltung nur eines bestimmten Triglycerids dürfte bei keinem der lipolytischen Mikroorganismen vorliegen. In dieser Richtung liegen keine Hinweise in der Literatur vor, außerdem erlauben die eigenen Untersuchungen auch für diejenigen Mikroorganismen keine derartige Aussage, bei denen lediglich eine Tributyrinspaltung festgestellt wurde, da die Untersuchungen nur eine begrenzte Anzahl von Triglyceriden erfaßten. Daher muß für die Tributyrinspalter eingeräumt werden, daß sie noch andere einfache Triglyceride spalten können und daß sie daher ebenso wie diejenigen Mikroorganismen, bei denen die Spaltung verschiedener Triglyceride oder Triglyceridgemische (natürliche Öle und Fette) nachgewiesen wurde, nur als relativ sub-

stratspezifisch (105 a) angesehen werden können. +)

Von der Substratspezifität zu trennen ist die quantitativ unterschiedliche Lipaseproduktion einzelner Mikroorganismen. Ein lipolytischer Keim, der nur wenig Lipase produziert, kann nur bei einer entsprechend geringen Triglyceridmenge die hydrolytische Spaltung bewirken; er wird als schwacher Fettspalter bezeichnet.

Die Differenzierung zwischen der quantitativ unterschiedlichen Lipaseproduktion und der Substratspezifität ist mit den biologischen Methoden nicht zu führen, denn sie sind nicht empfindlich genug. So kann eine sehr geringgradige Fettspaltung, die nicht ausreicht, um die Wasserstoffionenkonzentration soweit zu verändern, daß der Indikator einen Farbumschlag erfährt, mit biologischen Methoden nicht nachgewiesen werden. Damit entsteht der Anschein, daß von dem im Nährmedium enthaltenen Triglycerid oder Triglyceridgemisch nichts gespalten wurde.

4.32 Chemische Untersuchungen

Eine genauere Aussage zu der angeschnittenen Frage ist nur unter Verwendung chemischer Nachweismethoden möglich.

4.321 Säurezahl

Die Feststellung der Säurezahl in Triglyceriden, auf die fettspaltende Mikroorganismen eingewirkt haben, läßt eine quantitative Aussage über die freigesetzten Fettsäuren zu. So konnten für einzelne Mikroorganismen unterschiedliche Säurezahlen ermittelt werden. Dabei muß jedoch berücksichtigt werden, daß auch andere fettlösliche organische Säuren, sofern sie vorhanden sind, mit erfaßt werden (144), wodurch das Ergebnis verfälscht werden kann.

+) Die Frage der absoluten Substratspezifität wäre nur dann zu klären, wenn Versuchsbedingungen geschaffen werden könnten, bei denen die zu untersuchenden Triglyceride jeweils in der gleichen Emulsion, d.h. gleicher Teilchengröße vorliegen würden, da nur so der Faktor der verschiedenen Emulgierbarkeit der Triglyceride einigermaßen beherrscht werden könnte.

4.322 Chromatographische Trennung

Diese Fehlerquellen lassen sich durch die chromatographischen Verfahren ausschalten. Darüber hinaus ermöglichen diese Verfahren genaue qualitative und quantitative Aussagen über die freigesetzten Fettsäuren.

4.322 1 Papierchromatographie

Von den papierchromatographischen Methoden hat sich die von KAUFMANN und NITSCH (149) vorgeschlagene Arbeitsvorschrift bewährt. Wenn an Stelle der von ihnen verwendeten Petroleum-Fraktion vom Siedepunkt 190 - 200 °C/760 mm Undekan als Imprägnierungsmittel verwendet wurde, so erfolgte diese Modifikation, weil Undekan eher zu einer Standardisierung der Methode geeignet ist, als die in ihrer Zusammensetzung je nach dem Ausgangsmaterial wechselnde Petroleum-Fraktion, in der im übrigen neben Dodekan im wesentlichen Undekan enthalten ist. Schließlich wird bei der entsprechenden dünnschichtchromatographischen Methode ebenfalls Undekan verwendet (145).

Nachteilig wirkt sich bei der Papierchromatographie auf Undekan-imprägniertem Papier jede Temperaturänderung aus, da sich das Gleichgewicht zwischen dem Fließmittel und der Imprägnierung ändert. Bei Erhöhung der Temperatur wird das Undekan im Fließmittel gelöst (bis zur Einstellung einer neuen Sättigung) und die Trennung wird unscharf, während bei Temperaturerniedrigungen eine Übersättigung und Entmischung des Lösungsmittels eintritt mit der Folge, daß die Fettsäuren mit der Lösungsmittelfront laufen. Bei einer Laufzeit von ca. 20 Stunden läßt sich eine konstante Temperatur praktisch nur in einem klimageregelten Raum (besonderer Chromatographieraum) halten.

4.322 2 Dünnschichtchromatographie

Von den untersuchten dünnschichtchromatographischen Methoden hat diejenige, bei der mit undekanimprägnierten Platten gearbeitet wird, keinen wesentlich besseren Trenneffekt (145). Allerdings ist die Herstellung der Platten schwieriger und das Verfahren sehr temperaturempfindlich entsprechend dem papierchromatographischen Verfahren. Da die Laufzeit jedoch nur bis zu 1 Stunde beträgt, ist

es leichter, für diese Zeit die Arbeitstemperatur konstant zu halten. Die Untersuchungen haben gezeigt, daß eine Vielzahl von Variationsmöglichkeiten für die Zusammensetzung der Laufmittel gegeben ist, so daß für jedes Trennproblem die günstigste Kombination ermittelt werden sollte.

4.322 3 Gaschromatographie

Da für die Untersuchungen ein Gaschromatograph zur Verfügung stand, wurden nach der papier- und dünnschichtchromatographischen Methode nur Vergleichsbestimmungen durchgeführt, während die Hauptuntersuchungen gaschromatographisch mit dem Perkin-Elmer Fraktometer F 6 vorgenommen wurden.

Von den zur Trennung verwendeten stationären Phasen ist das Äthylenglykolsuccinat dem Apiezonfett M vorzuziehen, da es eine Trennung der gesättigten und ungesättigten Fettsäuren gleicher C-Atom-Zahl gestattet.

Bei einer Säulentemperatur von 210 ^{o}C konnten nur qualitative Ergebnisse erzielt werden, während eine quantitative Auswertung wegen der geringen Differenzen der Retentionszeiten nur überschläglich durchgeführt werden konnte. Bei Säulentemperaturen zwischen 180 und 200° ist eine bessere quantitative Auswertungsmöglichkeit gegeben. Mangels ausreichend dargestellter Fettsäuremethylester konnten diese Möglichkeiten nicht hinreichend wahrgenommen werden. Es empfiehlt sich daher, größere Mengen von Fett aufzuarbeiten, um eine genügend große Ausbeute an Estern zu bekommen.

Da sich das für die chromatographischen Untersuchungen verwendete Schweinefett im wesentlichen aus gesättigten und ungesättigten Fettsäuren mit 16 und 18 C-Atomen zusammensetzt, wurde als Vergleichsmaßstab für die einzelnen Proben untereinander das Verhältnis der Palmitinsäure zur Summe von Stearin- und Ölsäure gewählt.

Die Flächenverhältnisse der einzelnen Peaks sind nur relativ, da Korrekturfaktoren, die sich aus der Relation zwischen Peakfläche und Menge der aufgegebenen Substanz ergeben, nicht berücksichtigt sind. Für den Vergleich der Fettsäurenverteilungen in den untersuchten Mischungen genügen jedoch die relativen Verhältniswerte.

Qualitativ sind in allen untersuchten Proben gaschromatographisch die gleichen Komponenten nachzuweisen. Dagegen ist das Verhältnis der Fettsäuren mit 16 C-Atomen zu denen mit 18 C-Atomen unterschiedlich. Allerdings schwankt der Quotient nur in geringen Grenzen. Das überrascht insofern nicht, als sowohl den Reinkulturen als auch der Keimflora in den untersuchten Rohwürsten Schweinefett als Material für die hydrolytische Spaltung zur Verfügung stand und insofern im wesentlichen entsprechende Werte zu erwarten waren.

4.323 Weitere Untersuchungen

Von den im Anschluß an die gaschromatographische Trennung verwendbaren Untersuchungsmethoden wurde nur die Infrartospektrophotometrie orientierend in den Untersuchungsgang aufgenommen, da für die Aufgabenstellung der Fettsäurentrennung von der Ultraviolett- und Massenspektrometrie keine nennenswerten Ergebnisse zu erwarten waren.

Da eine Fraktionssammeleinrichtung zum Gaschromatographen nicht zur Verfügung stand, konnten die IR-spektrophotometrischen Untersuchungen allein an Testsubstanzen vorgenommen werden. Dabei zeigte es sich, daß lediglich eine Unterscheidung zwischen Fettsäuren und Estern möglich ist. Wenn auch aus diesem Grunde eine Fettsäurentrennung nicht möglich ist, so wird dieses Verfahren doch bei der Analyse der weiteren Abbauprodukte im Verlauf der Fettspaltung wertvolle Hilfe leisten können.

4.33 Bedeutung biologischer und chemischer Methoden für den Nachweis der Substratspezifität

Wie die Untersuchungsergebnisse gezeigt haben, lassen sich große Unterschiede in der Zusammensetzung der Fettsäuremischungen nicht feststellen, so daß nach diesen Untersuchungen die Frage, inwieweit nur eine quantitativ unterschiedliche Lipaseproduktion bei einzelnen Mikroorganismen oder eine Substratspezifität vorliegt, nicht befriedigend beantwortet werden kann. Entsprechend den biologischen Methoden, bei denen verschiedene Triglyceride rein oder in Form natürlicher Öle und Fette dem Nährmedium jeweils zugesetzt wurden, sollten in der Nährbodenflasche auf der Schüttelapparatur einzelne Triglyceride (mit nie-

deren angefangen in aufsteigender Reihenfolge) dem Einfluß von Reinkulturen ausgesetzt werden. Auf diese Weise ließe sich feststellen, in welchem Maße die in Reinkultur zugesetzten Mikroorganismen die einzelnen Triglyceride angreifen. Nur durch derartige systematische Untersuchungen wird sich die bisher bei der biologischen Methode nachgewiesene bessere Spaltbarkeit von niederen Triglyceriden gegenüber höheren quantitativ untermauern lassen.

Als praktische Folgerung ergibt sich die Möglichkeit, den biologischen Nachweis der fettspaltenden Eigenschaften von Mikroorganismen über eine Triglyceridreihe (aufsteigend) zu prüfen und daraus Schlüsse auf ihre lipolytische Aktivität und Substratspezifität zu ziehen, ohne chemische Methoden einschalten zu müssen. (Dabei wird jedoch der Wert gerade der chromatographischen Untersuchungsmethoden auf dem Gebiet der weiteren Fettsäurenabbauprodukte - insbesondere in der Aromaforschung - unbestritten bleiben.)

Ob allerdings die vorgeschlagene aufsteigende Triglyceridreihe auch zur Differenzierung von Mikroorganismen herangezogen werden kann, erscheint nach den bisherigen Untersuchungen, soweit sie in der Literatur beschrieben sind, und auch nach den Ergebnissen eigener Untersuchungen zweifelhaft. So konnte bisher eine charakteristische Triglyceridspaltung für alle Species einer Gattung von Mikroorganismen nicht nachgewiesen werden. Das besagt, daß die Fähigkeit, Triglyceride zu spalten, nicht als gattungsspezifisch angesehen werden kann. Es soll jedoch die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, innerhalb der Gattungen verschiedene Spezies auf diese Weise zu differenzieren. +)

+) ANDREJEW, GERNEZ-RIEUX und TAQUET (7) haben darauf hingewiesen, daß zwischen der Pathogenität von Mycobakterien und ihrem Triglyceride-Spaltungsvermögen eine umgekehrt proportionale Relation bestehen soll (die typischen Tbc-Erreger werden als praktisch lipolytisch inaktiv dargestellt). Auf der gleichen Ebene liegt der Versuch von BAIRD-PARKER (15 a), die lipolytischen Fähigkeiten von Mikroorganismen gegenüber Eigelbfett zur Klassifikation von Mikrokokken und Staphylokokken mit heranzuziehen. Die Methode von BAIRD-PARKER ist von TERPLAN (303) übernommen worden, um Differenzierungsmerkmale für euterpathogene Micrococcaceae zu gewinnen. Er konnte die Ergebnisse von BAIRD-PARKER nicht bestätigen und erklärte diese Inkongruenz der Ergebnisse damit, daß die für humanpathogene Bakterien ausgearbeitete Klassifikationsmethode möglicherweise nicht auf die Verhältnisse beim Tier zu übertragen sei.

4.4 Milieuabhängigkeit der Nachweise

Jede Aussage über fettspaltende Eigenschaften von Mikroorganismen muß, wenn sie auf Modellversuchen fußt - wie den biologischen Nachweisen auf Fettnährböden und den Fettabbauversuchen in der Nährbodenflasche - unter dem Vorbehalt einer mehr oder weniger großen Divergenz zu den tatsächlichen biochemischen Abläufen im Lebensmittel gesehen werden.

So läßt sich im Modell das Milieu nie reproduzieren, das die Mikroorganismen im Lebensmittel vorfinden. Auf der anderen Seite ist jedoch die Möglichkeit gegeben, bestimmte Faktoren des Milieus definiert zu beherrschen und dadurch Rückschlüsse auf die lipolytische Aktivität zu ziehen. Insofern soll das bereits unter dem Gesichtspunkt der unterschiedlich spaltbaren Triglyceride angeschnittene Problem der Substratspezifität von der Seite des Milieus her erörtert werden.

4.41 Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration

Eine optimale Lipolyse wird allgemein im sauren p_H-Bereich beobachtet (243, 287, 218, 219, 215).

Besonders in fermentierenden Lebensmitteln tierischer Herkunft setzt im Laufe der Reifung eine Säuerung ein, die bakteriell bedingt ist. Die Literatur zu dieser mikrobiell bedingten Säuerung hat TERPLAN (304) umfassend referiert. Er stellt dabei u.a. heraus, daß schnellgereifte Würste in der Regel etwas saurer sind als langsam gereifte. Das konnte in etwa auch durch die p_H-Wert-Messungen bei Untersuchung der Rohwurstproben bestätigt werden, wenngleich die festgestellten Unterschiede nur sehr gering waren. Bei dem Modellversuch zur Abhängigkeit der Lipolyse von der Wasserstoffionenkonzentration fiel auf, daß auch im alkalischen Milieu die Lipolyse nur unwesentlich abnahm.

+) Fortsetzung der Fußnote von Seite 88

Damit zeichnet sich bisher lediglich die Möglichkeit ab, Mikroorganismen, die sich in allen Eigenschaften - ausgenommen Lipolyse - gleich verhalten, zu differenzieren. Zu prüfen wäre allerdings, ob die lipolytische Aktivität konstant ist. In diese Richtung geht der Differenzierungsversuch von ANDERSON und HARDENBERGH (6), einen in Rahm gefundenen Keim, der als charakteristisches Merkmal lediglich die Fettspaltung aufwies, systematisch einzuordnen.

4.42 Sauerstoffabhängigkeit der mikrobiellen Fettspaltung

Die überwiegende Zahl der fettspaltenden Mikroorganismen wird als aerob beschrieben (248, 249, 79), während nur unter besonderen Bedingungen (z.B. aus der Pansenflora des Schafes (105)) strikt anaerobe Fettspalter nachgewiesen wurden.

Die Ergebnisse, die mit der einfachen Versuchsanordnung der Agarröhrchen (Schüttelkulturen) erzielt wurden, zeigen, daß die untersuchten Keime unter aeroben Bedingungen Fett spalten. Im allgemeinen nimmt die Intensität der Fettspaltung von der Oberfläche nach unten ab. Das soll jedoch nicht besagen, daß lediglich die Lipaseaktivität bei abnehmendem Sauerstoffangebot zurückgeht, vielmehr dürfte das Bakterienwachstum überhaupt in der Tiefe der Agarröhrchen geringer sein als an der Oberfläche, weshalb nur eine kleinere Menge von Fettspaltern zur Verfügung steht. Diese Auffassung wird dadurch gestützt, daß im Laufe der Bebrütung ein Teil der Keime, insbesondere relativ unempfindliche Mikrokokken und Staphylokokken, im gesamten Nährbodenröhrchen eine intensive Fettspaltung bewirkten, während andere offenbar konstant auf die oberen Zonen beschränkt blieben. Eine geringe Zunahme der Spaltung im Verlauf der Bebrütung konnte bei fast allen Stämmen beobachtet werden. Daraus geht hervor, daß die Sauerstoffansprüche der untersuchten Keime unterschiedlich sind und damit auch notwendigerweise eine unterschiedliche Fettspaltung erfolgt.

Diese Versuchsanordnung mit den Agarröhrchen dürfte den tatsächlichen Verhältnissen in Lebensmitteln nahekommen, da auch hier sauerstoffreiche Zonen in den oberflächlichen Bereichen sauerstoffärmeren in der Tiefe gegenüberstehen (249, 79).

4.43 Chemische Einflüsse

Von den vielfältigen chemischen Momenten, die die mikrobielle Fettspaltung beeinflussen können, seien nur diejenigen diskutiert, welche bei den Untersuchungen berücksichtigt werden müssen.

4.431 Einfluß von Kochsalz

In Lebensmitteln, insbesondere in Rohwürsten ist ein bestimmter Salzgehalt vorhanden. Um Vorstellungen über dessen Wirkung auf Mikroorganismen zu erhalten, wurde einigen Nährböden Kochsalz in unterschiedlicher Konzentration zugesetzt; wenn auch bei höheren Salzkonzentrationen nur eine geringere Wachstumshemmung bei einigen Keimen zu beobachten war, so ist doch zu berücksichtigen, daß in verschiedenen Lebensmitteln tierischer Herkunft mit einer Erhöhung des Kochsalzgehaltes ein Absinken des Wassergehaltes mit entsprechend stärkerer Wachstumshemmung parallel läuft. Unter diesem Gesichtspunkt sind auch die von SCHELS und HADZIHALILOVIĆ (265) festgestellten Keimzahlen bei den Rohwurstversuchen zu sehen.

4.432 Einfluß von Indikatoren und Emulgatoren

Der Einfluß von Indikatoren auf fettspaltende Mikroorganismen ist von geringer Bedeutung, wie die eigenen Untersuchungen gezeigt haben. Die direkte (Tributyrin-) Methode ergab nur wenig mehr positive Ergebnisse als die indirekte (Indikator-) Methode. Als ebenfalls wenig bedenklich kann der Zusatz von Tween 80 zu Fettnährböden angesehen werden. Lediglich bei Streptokokken und Laktobazillen konnte in mehreren Fällen eine Wachstumshemmung nachgewiesen werden. Da jedoch vor allem Laktobazillen besondere Ansprüche an das Nährmedium stellen, müssen die festgestellten Wachstumshemmungen nicht a priori durch das Tween 80 bedingt sein. Zwar handelt es sich bei den Tweens um Polyoxyäthylenderivate von Sorbitanhydriden, die zum Teil mit Fettsäuren verestert sind - so ist Tween 80 Polyoxyäthylensorbitanmonooleat -, um Verbindungen also, die ebenfalls hydrolytisch gespalten werden können; bei der geringen Menge des Zusatzes zum Nährboden dürften diese Abbauprodukte jedoch nicht ins Gewicht fallen.

4.433 Einfluß des weiteren Abbaus der Fettsäuren auf die Nachweise

Wenn NASHIF und NELSON (214) eine Erhöhung der Fettspaltung durch Zugabe von freien Fettsäuren erreichen konnten, während auf der anderen Seite LAXA (172), STOCKOE (297), HAAG (80), TÄUFEL, THALER und LOEWENECK (300)

sowie SPIEKERMANN (285) eine wachstumshemmende Wirkung von niederen Fettsäuren auf lipolytische Mikroorganismen beschrieben haben, so müssen diese gegensätzlichen Phänomene nicht unvereinbar sein. Schließlich ist es vorstellbar, daß geringe Fettsäuremengen die Fermentreaktion der Lipolyse aktivieren (Initialaktivierung), daß sich anschließend ein Gleichgewicht einstellt und schließlich durch ein Überangebot an Reaktionsprodukten (Fettsäuren) der fermentative Prozeß zum Stehen kommt. Diese Überlegungen führen in den Bereich der Kinetik enzymatisch katalysierter Reaktionen (vgl. dazu die Darstellung von HOFFMANN-OSTENHOF (105 a), in der die theoretischen Grundlagen ausführlich beschrieben werden). Die Bedeutung des Gleichgewichtes zwischen Triglyceriden, Lipase und freien Fettsäuren für die Aussagekraft der Fettspalternachweise wird deutlich, wenn man den weiteren Abbau der Fettsäuren in Betracht zieht. So bewirkt der Abbau eine fortwährende Störung des Gleichgewichts mit der Folge, daß es dadurch zur Aktivierung der Lipolyse und zur dauernden Einstellung neuer Gleichgewichte kommt. (Zur Klärung dieser Fragen dürften Modelluntersuchungen mit rein dargestellten (213, 302) Lipasen beitragen können, wobei zur Reindarstellung moderne Verfahren wie die Gelfiltrations- bzw. Molekularsiebmethode verwendet werden sollten.) Daneben besteht auch die Möglichkeit, daß einige der Reaktionsprodukte bakterizid wirken können.

Es würde zu weit führen, auf die autoxydative Seite des Fettsäurenabbaus einzugehen. Vielmehr sei nur auf einige mikrobiell bedingte Vorgänge hingewiesen. Von Mikroorganismen werden neben Hydrolasen auch Oxydasen gebildet (129, 209, 325, 303). Ob jedoch bei der mikrobiell bedingten Oxydation keine Oxysäuren gebildet werden, was in der Literatur teilweise behauptet wird (80, 266, 285), muß bezweifelt werden. So ist gerade die Ketonranzigkeit durch mikrobielle Einwirkung auf die freigesetzten Fettsäuren bedingt (254, 305). Im übrigen sei hinsichtlich des mikrobiellen Fettsäureabbaus auf die Ausführungen von TERPLAN (304) verwiesen.

4.5 Relativer Wert der Nachweise

Durch die Abhängigkeit vom Milieu sowie durch den weiteren Fettsäureabbau, der sich nicht in ein System bringen läßt, da die Abbauvorgänge nicht konsequent nacheinander, sondern parallel ablaufen, wird die Aussagekraft der verwendeten Nachweise eingeschränkt. Nicht die freigesetzten Fettsäuren werden nachgewiesen, sondern nur die Differenzmenge zwischen freigesetzten und bereits weiter abgebauten Fettsäuren.

In Lebensmitteln beeinflussen außerdem die Vorgänge des Eiweiß- und Kohlenhydratabbaus die Aussagekraft der Nachweise. Daher sollte zunächst versucht werden, in Modellversuchen die Zusammenhänge von Fett-, Eiweiß- und Kohlenhydratabbau aufzuklären. Nicht zuletzt sind synergistische und antagonistische Beziehungen der Mikroorganismen untereinander zu berücksichtigen (304), ferner die Wirkung originärer Lipasen, soweit diese nicht - wie teilweise bei den Modellversuchen durch Erhitzen der Fette inaktiviert werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

1. Das Schrifttum über die mikrobielle Fettspaltung sowie den Nachweis der freien Fettsäuren wurde referiert.

2. In eigenen Versuchen wurden bekannte und z.T. modifizierte histologische, biologische und chemische Methoden zum Nachweis der hydrolytischen Fettspaltung durch Mikroorganismen vergleichend studiert.

3. Histologisch läßt sich die Lokalisation des mikrobiellen Fettabbaus bestimmen.

4. Von den biologischen Methoden sind die direkten zum Nachweis der Spaltung niederer und die indirekten bevorzugt zum Nachweis der Spaltung höherer Triglyceride geeignet. Zur Vermeidung von Indikatorfehlern sollten allerdings die indirekten Methoden immer mit einer direkten Methode gekoppelt werden.

5. Die chemischen Methoden erlauben Aussagen über Art und Umfang der durch mikrobielle Hydrolyse freigesetzten Fettsäuren. Während über die Bestimmung der Säurezahl nur Gesamtfettsäurezahlen erhalten werden können, erlauben die chromatographischen Trennverfahren, insbesondere die Gaschromatographie eine genaue Analyse der Fettsäurenzusammensetzung.

6. Die untersuchten Mikroorganismen spalten verschiedene Triglyceride unterschiedlich. Den mit Hilfe der Säurezahlen festgestellten signifikanten Unterschieden der Gesamtmenge an Fettsäuren stehen nur geringe Schwankungen in der qualitativen Zusammensetzung der freigesetzten Fettsäuren gegenüber. Analog konnte auch bei der Untersuchung von Rohwurstfett eine geringe Schwankungsbreite festgestellt werden.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Agre, C.L., und J. Cason: Complexity of the mixture of fatty acids from tubercle bacillus. Acids with less than twenty carbon atoms. J. Biol. Chem. 234 (1959), 2555;

2. Alford, J.A., und L.E. Elliott: Lipolytic activity of microorganisms at low and intermediate temperatures. I. Action of Pseudomonas Fluorescens on lard. Food Res. 25 (1960), 196;

3. Ambrose, D., und R.R. Collerson: Use of gas-liquid partition chromatography as a preparative method. Nature 177 (1956), 84;

4. Anderson, J.A.: An agar plate method for the detection and enumeration of lipolytic microorganisms. J. Bact. 27 (1934), 69;

5. Anderson, J.A.: Spoilage of cream at low temperatures. Ann. Conv. Inst. Assoc. Milk Dealers 1937, Ref. in: J. Dairy Sci. (Abstr.) 21 (1938), 233;

6. Anderson, J.A., und J.G. Hardenbergh: The deterioration of cream by a lipolytic bacterium. J. Bact. 23 (1932), 59;

7. Andrejew, A., C. Gernez-Rieux und A. Tacquet: Activité lipasique des bacilles tuberculeux et des mycobactéries atypiques. Ann. Inst. Pasteur 99 (1960), 56;

8. Annison, E.F.: Studies on the volatile fatty acids of sheep blood with special reference to formic acid. Biochem. J. 58 (1954), 670;

9. Annison, E.F., K.J. Hill und D. Lewis: Studies on the portal blood of sheep. II. Absorption of volatile fatty acids from the rumen of sheep. Biochem. J. 66 (1957), 592;

10. Anselmi, S.: Chromatography in fat analyses. Olearia 15 (1961), 61; Ref. in: Chem. Abstr. 55 (1961), 25293;

11. Anselmi, S., L. Boniforti und R. Monacelli: Die Dampfphasen-Chromatographie von Fetten. II. Die Arbeitsmethodik und die Chromatogramme einiger pflanzlicher und tierischer Öle und Fette. Boll. Lab. chim. provinciali 11 (1960), 257; Ref. in: Fette-Seifen-Anstrichmittel 64 (1962), 1069;

12. Aristova, V., und A.Karysheva: Determination of volatile fatty acids by the chromatographic method. Molochnaya Prom. 19 (1958) Nr. 10, 35, Ref. in: Chem. Abstr. 53 (1959), 4016;

13. Asselineau, J.: Application of chromatography to fatty acids. Chim. anal. 39 (1957), 375; Ref. in: Chem. Abstr. 52 (1958), 4415;

14. Atkinson, E.P., und G.A.P. Tuey: Gas chromatography 1958, Amsterdam Symposium, May 1958, Butterworths, London 1958, S. 270, 283;

15. Averey, O.T., und G.E. Cullen: Studies on the enzymes of Pneumococcus. Lipolytic enzymes: esterase. J. Exptl. Med. 32 (1920), 571;

15a. Baird-Parker, A.C.: A classification of Micrococci and Staphylococci based on physiological and biochemical tests. J. gen. Microbiol. 30 (1963), 409;

16. Barnabas T., und J. Barnabas: Eine Bemerkung zur Trennung gesättigter Fettsäuren durch Rundfilterchromatographie. Naturwissenschaften 44 (1957), 281;

17. Bayer, E.: Gaschromatographie, 2. Aufl., Berlin-Göttingen-Heidelberg 1962;

18. Beckman, H.F., und D.G. Crosby: Mikroanalysis by gas chromatography. Food Technol. 17 (1963), 1244;

19. Bergner, K.H., und H. Sperlich: Anwendungen der Papierchromatographie bei der Untersuchung von Lebensmitteln. Mitt. Gebiete Lebensmittelunters. Hyg. 44 (1953), 388;

20. Berry, J.A.: Detection of microbial lipase by copper soap formation. J. Bact. 25 (1933), 433;

21. Bertók, L., und F. Kemenes: Studies on the lipase-system of Leptospirae. 1. Tributyrinase activity. Acta Microb. Hung. 7 (1960), 251;

22. Beynon, J.H.: Qualitative analysis of organic compounds by mass spectrometry. Nature 174 (1954), 735;

23. Beynon, J.H.: The use of the mass spectrometer for the identification of organic compounds Mikrochim. Acta 1956 (1-3), 437; Ref. in: Chem. Abstr. 50 (1956), 8394;

24. Bieri, J.G., C.J. Pollard, I. Prange und H. Dam: The determination of α-tocopherol in animal tissues by column chromatography Acta Chem. Scand. 15 (1961), 783;

25. Binder, R.G., T.H. Applewhite, G.O. Kohler und L.A. Goldblatt: Chromatographic analysis of seed oils. Fatty acid composition of castor oil. J. Am. Oil Chemists' Soc. 39 (1962), 513;

26. Boeminghaus, H.: Über den Wert der Nilblaumethode für die Darstellung der Fettsubstanzen und den Einfluß einer längeren Fixierung, Beitr. Path. Anat. u. Allg.Path. 67 (1920), 533;

27. Boldingh, J.: Oils and fats for the benifit of mankind: current problems with respect to production, processing and nutrition. Vortrag auf dem 1. Welt-Fett-Kongreß vom 12.-18. Oktober 1964 in Hamburg (nicht veröffentl.);

28. Bragdon, J.H., und A. Karmen: Fatty acids composition of chylomicrons of chyle and serum following the indigestion of different oils. J. Lipid Res. 1 (1960), 167;

29. Brown, H.J.: A study of anaerobic bacteria. J. Bact. 10 (1925), 513;

30. Buchanan, M.A.: Paper chromatography of the saturated fatty acids. Anal. Chem. 31 (1959), 1616;

31. Buchanan, R.E.: Agricultural and Industrial Bacteriology. New-York 1921, S. 166;

32. Bürger, L.: Eine neue Methode des Nachweises verdorbener fetthaltiger Nahrungsmittel. Dt. Med. Wschr. 73 (1948), 253;

33. Bullock, K.: The inactivation of enzymes and microorganisms in oils and powders. I. The thermolability of lipase in powder form and in suspension in oil.
Quart. J. Pharm. Pharmaco. 20 (1947), 299;

34. Burma, D.P.: Der Trennungsmechanismus der Papierchromatographie.
Anal. Chem. 25 (1953), 549;
Ref. in: Fette-Seifen-Anstrichmittel 57 (1955), 312;

35. Buttery, R.G., und R. Teranishi: Food vapors analysis.
J. Agric. Food Chem. 11 (1963), 504;

36. Cain, A.J.: The use of nile blue in the examination of lipids.
Quart. J. Micr. Sci. 88 (1947), 383;

37. Cain, A.J.: A further note on nile blue.
Quart. J. micr. Sci. 89 (1948), 1;

38. Capella, P., G. de Zotti, G.S. Ricca, A.F. Valentini und G. Jacini: Chromatography on silicic acid of the unsaponifiable matter of fats.
J. Am. Oil Chemists' Soc. 37 (1960), 564

39. Carnot, P., und H. Mauban: Réaction colorée de la stéapsin sur plaques de gélose graisse emulsionnée par production de savon de cuivre
Compt. rend. Soc. de biol. 81 (1918), 98;

40. Cason, J., und E.R. Harris: Utilisation of gas-phase chromatography for identification of volatile products from alkaline degradation of herqueinone.
J. Org. Chem. 24 (1959), 676;

41. Castell, H.C., und L.R. Bryant: Action of micro-organisms on fats. I. The significance of color changes in dyes used for the detection of microbial action on fat. Iowa State Coll. J. Sci. 13 (1939), 313;

42. Chandan, R.C., M.G. Carrencedo und K.M. Shahani: Sensitivity of microbial lipases to antibiotics. J. Dairy Sci. 45 (1962), 1312;

43. Chowdhury, D.K., K.S. Chandra und S. Mukherji: Über die Anwendung der papierchromatographischen Analyse auf dem Fettgebiet. I. Mitt.: Über das Samenöl von Basella rubra. Nahrung 3 (1959), 252;

44. Clement, G. und J. Bezard: Gas chromatographic analysis of mixtures of fatty acids containing more than 4 carbon atoms. Compt. rend. 253 (1961), 564; Ref. in: Gas Chromatog. Abstr. 1961, 814;

45. Clifford, J.: Preparative gas-liquid chromatography. Chem. a. Ind. 1960, 1595;

45a. Cohen, B., und P.W. Preisler Studies on oxidation-reduction, XVI. The oxazines: nile blue, brillant cresyl blue, methyl capri blue, and ethyl capri blue. Supplement No. 92 to the Public Health Report US Government Printing Office, Washington 1931, S. 57;

46. Collins, M.A., und B.W. Hammer: The action of certain bacteria on some simple triglycerides and natural fats, as shown by nile-blue sulphate. J. Bact 27 (1934), 473;

47. Cooke, N.J., und R.P. Hansen: Tall oil isolation and identification of n-heptadecanoic acid. Chem. a. Ind. 1959, 1516;

48. Coretti, K.: Vorkommen und Bedeutung von lipolytischen Mikroorganismen in Dauerwürsten. Fleischwirtschaft 45 (1965), 21;

49. Crawford, R.V.: Gas chromatography for the routine analysis of fatty oils. Chem. a. Ind. 1960 (3), 68;

50. Creech, B.G.: Column chromatography - introduction and general considerations. J. Am. Oil Chemists' Soc. 38 (1961), 538;

51. Creech, B.G.: Isolation of neutral lipids by column chromatography. J. Am. Oil Chemists' Soc, 38 (1961), 540;

52. Cutchins, E.C., R.N. Doetsch und M.J. Pelczar, jr.: The influence of medium composition on the production of bacterial lipase. J. Bact. 63 (1952), 269;

53. Davenport, J.B.: Column partition chromatography of the fatty hydroxamic acids. Chem. a. Ind. 1955, 705;

54. Demeter, K.J.: Molkereibakteriologie, 1. Mikroorganismen in der Milch, in: F. Löhnis, Handbuch der landwirtschaftlichen Bakteriologie, 2. Auf., Bd. 1, Tl. II (nicht veröffentlicht);

55. Demeter, K.J.: Mikrobiologie der Butter, Stuttgart 1956;

56. Derx, H.G.: The splitting up of fats by oxydation caused by molds. Verslag. Akad. Wetenschappen Amsterdam 33 (1925), 545, Ref. in: Chem. Abstr. 19 (1925), 2354;

57. Diemair, W. und E. Schams: Gas-Chromatographie in der Lebensmittelanalytik. I. Mitt. Bestimmung der niederen, flüchtigen Fettsäuren in Lebensmitteln. Fette-Seifen-Anstrichmittel 64 (1962), 170;

58. Duncan, W.R.H., und G.A. Garton: The C_{18} fatty acids of ox plasma lipids. J. Lipid Res. 3 (1962), 53;

59. Eijkman, C.: Über Enzyme bei Bakterien und Schimmelpilzen. Cbl. Bact. I. Orig. 29 (1901), 841;

59a. Endres, H., W. Graßmann und M. Oppelt: Chromatographisches Verhalten organischer Substanzen verschiedener Verbindungsklassen gegenüber Polyamid. Hoppe-Seyler's Ztschr. physiol. Chem. 317 (1959), 21;

60. Eisenberg, G.M.: A nile blue culture medium for lipolytic microorganisms. Stain Technology 14 (1939), 63;

61. El Sadek, G.M., und T. Richards: The effect of the heat treatment on the lipolytic flora of cream. J. Dairy Res. 22 (1955), 295;

62. Eser, H., und F.P. Niinivaara: Gaschromatographische Untersuchungen über das Aroma von Rohwurst. Z. Lebensmittel-Untersuch. u. -Forsch. 124 (1964), 245;

63. Ette, K.O., und E.H. Ahrens: Quantitative gas-liquid chromatography of short chain fatty acids 2-chloroethanol esters. Anal. Chem. 33 (1961), 1847;

64. Fierz-David: Die Ranzigkeit der Fette. Angew. Chem. 38 (1925), 6;

65. Fischler: Über die Unterscheidung von Neutralfetten, Fettsäuren und Seifen im Gewebe. Zbl. Path. 15 (1904), 913;

66. Fodor, P.J., und A. Chari: The ester-hydrolizing systems of Aspergillus niger and of Penicillium roqueforti. Enzymologia 13 (1949), 258;

67. Forster, T.L., H.A. Bendixen und M.W. Montgomery: Some esterases of cows' milk. J. Dairy Sci. 42 (1959), 1903;

68. Frahke, W., und W. Heinen: Zur Kenntnis des Fettsäureabbaus durch Schimmelpilze. I. Mitt. über die Methylketonbildung der Schimmelpilze. Arch. Microbiol. 31 (1958), 50;

69. Franke W., A. Platzeck und G. Eichhorn: Zur Kenntnis des Fettsäureabbaus durch Schimmelpilze. IV. Mitt. Versuche zum weiteren Umsatz der Methylketone. Arch. Microbiol. 41 (1962), 154;

70. French, R.B.: Analysis of pecan, peanut and other oils by gas-liquid chromatography and ultraviolet spectrophotometry. J.Am. Oil Chemists' Soc. 39 (1962), 176;

71. Geffers: Zit. n. 54;

72. Gehrke, C.W., und W.M. Lamkin: Quantitative determination of steamvolatile fatty acids by gas-liquid chromatography. J. Agr. Food Chem. 9 (1961), 85;

73. Girolami, R.L., und S.G. Knight: Fatty acid oxidation by Penicillium roqueforti. Appl. Microbiol. 3 (1955), 264;

74. Goldman, M.L., und M.M. Rayman: Hydrolysis of fats by bacteria of the Pseudomonas genus. Food Res. 17 (1952), 326;

75. Goodman, J.J.: Adaptive production of amylase and lipase by three species of fungi. Science 112 (1950), 176;

76. Gorbach, G.: Über die "Test-Tube"-Methode. Fette-Seifen-Anstrichmittel 59 (1957), 921;

77. Gorbach, G., G. Dedic und K. Lorenz: Zur Anreicherung und Wirksamkeitsbestimmung von Bakterienlipasen. Arch. Mikrobiol. 21 (1955), 237;

78. Gorbach, G., und C. Weber: Die Test Tube-Chromatographie zum Nachweis von Verfälschungen des Kürbiskernöles. Fette-Seifen-Anstrichmittel 65 (1963), 989;

79. Gratz, O.: Die Fettspaltung in der mehrere Tage nach der Herstellung umgearbeiteten Butter. Milchwiss. Forsch., Orig. 6 (1928), 133;

80. Haag, F.E.: Die Zersetzung der Fette durch Bakterien. Arch. Hyg. 100 (1928), 271;

81. Hänni, H.: Die gaschromatographische Bestimmung fremder Fette im Butterfett. Kieler Milchwirtsch. Berichte 15 (1963), 407 ;

82. Hänni, H., und W. Ritter: Die Gaschromatographie und ihre Anwendung in der Milchwirtschaft. I. Mitt. Das Prinzip der Methode und einige Möglichkeiten ihrer Anwendung. Milchwiss. 14 (1959), 524;

83. Hänni, H., und W. Ritter: Die Gaschromatographie und ihre Anwendung in der Milchwirtschaft. IV. Mitt.: Die Fettuntersuchung. Milchwiss. 19 (1964), 1;

84. Hal'ama, D.: Bestimmung flüchtiger Fettsäuren mittels der Papier-Chromatographie. Chem. Zvesti 13 (1959), 454; Ref. in: Fette-Seifen-Anstrichmittel 63 (1961), 1178;

85. Hall, R.J.: An apparatus for large scale preparative chromatography with special application to the separation of long chain fluoro-fatty acids. J. Chromatog. 5 (1961), 93;

86. Hallmann, L.: Bakteriologie und Serologie, 3. Aufl., Stuttgart 1961;

87. Hamilton, J.G., und J.E. Muldrey: Glass paper chromatography of lipids. J. Am. Oil Chemists' Soc. 38 (1961), 582;

88. Hammer, B.W., und M.A. Collins: The number of lipolytic bacteria in various dairy products, as determined with nile-blue sulfate. Iowa State Coll. of Agric. Res. Bull. 169 (1934), 75; Ref. in: Milchwiss. Forsch. 16 (1934), 113;

89. Hanahan, D.J., J.C. Dittmer und E. Warashina: Die säulenchromatographische Trennung verschiedener Phospholipid-Klassen. J. Biol. Chem. 228 (1957), 685; Ref. in: Fette-Seifen-Anstrichmittel 60 (1958), 1959;

90. Hankinson, C.L., W.J. Harper und E. Mikolajcik: A gas-liquid chromatographic method for volatile fatty acids in milk. J. Dairy Sci. 41 (1958), 1502;

91. Hawke, J.C.: The volatile fatty acids of bovine muscle and liver phospolipoids. Biochem. J. 64 (1956), 311;

92. Hawke, J.C., R.P. Hansen und F.B. Shorland: Gas-liquid chromatography: Retention volumes of the methyl esters of fatty acids with special reference to n oddnumbered, iso and (+) anteiso acids. J. Chromatog. 2 (1959), 247;

93. Hawkins, J.E., J.R. Thurston und W. Steenken jr.: The effect of filtration on biologic products. Am. Rev. Tuberc. 84 (1961), 850;

94. Hellermann, J.L., und H. Schlenk: Die Säulenchromatographie der Lipoide: Die ungradzahligen, unverzweigten Fettsäuren des Menhaden-Öles. Experientia (Basel) 15 (1959), 387;

95. Henneberg: Die Wichtigkeit der Chinablauagar-Petrischalen für die bakteriologischen Untersuchungen in milchwirtschaftlichen Laboratorien. Molkerei-Ztg. 44 (1930), 363;

96. Henneberg: Zur Kenntnis der Alkalibildner in der Milch (Milchfehler und ihre Bekämpfung). Milchwiss. Forsch. 12 (1931), 222;

97. Henneberg: Zit. n. 54;

98. Henneberg: Über die Bakterien im gesunden Kuheuter. Molkerei-Ztg. 46 (1932), 1782;

99. Henneberg: Bakteriologische Molkereikontrolle, Berlin 1934;

100. Henneberg und Kniefall: Über die Gruppe Scopulariopsis brevicaulis (=Penicillium brevicaule) Milchwiss. Forsch. 13 (1932), 520;

101. Herb, S.F., P. Magidman, F.E. Luddy und R.W. Riemenschneider: Fatty acids of cows' milk. B. Composition by gas-liquid chromatography aided by other methods. J. Am. Oil Chemists' Soc. 39 (1962), 142;

102. Herter: The influence of food and of epithelial atrophy on the manifestations of saccharo-butyric intestinal putrefaction. J. of the Americ. med. Ass. 49 (1907), No. 24, 25;

103. Hilditch, T.P.: The industrial chemistry of fats and waxes, London 1927, S. 276;

104. Hileman, J.L. und E. Courtney: Seasonal variations in the lipase content of milk. Abstr. 29. Ann. Meeting Amer. Dairy Sci. Assoc. 1934, 60; Ref. in: Milchwiss. Forsch. 17 (1934-36), 26;

105. Hobson, P.N., und S.O. Mann: The isolation of glycerol-fermenting and lipolytic bacteria from the rumen of the sheep. J. gen. Microbiol. 25 (1961), 227;

105a. Hoffmann-Ostenhof, O.: Enzymologie, Wien 1954;

106. Hood, E.G., C.A. Gibson und J.F. Bowen: Lipolytic bacteria a cause of rancidity in Cheddar Cheese. Canadian Dairy and Ice Cream J. 28 (1949) No. 2, 27;

107. Hornstein, I., und P.F. Crowe: Flavour studies on beef and pork. J. Agr. Food Chem. 8 (1960), 494;

108. Hornstein, I., L.E. Elliott und P.F. Crowe: Gas chromatography separation of long chain fatty acid methyl esters on polyvinyl acetats. Nature 184 (1959), 1710;

109. Horowitz-Wlassowa L.M. und M.J. Livschitz: Zur Frage der Wirkung der Mikroben auf Fette. Zbl. Bakt. II 92 (1935), 424;

110. Houben-Weyl: Methoden der organischen Chemie, 4. Aufl., Stuttgart 1953;

111. Houghton, A.A., und N.A. Tund: Application of gas chromatography to fat analyses. Rev. intern. chocolat. 15 (1959), 470, Ref. in: Chem. Abstr. 54 (1960), 10178;

112. Hubscher, G., J.N. Hawthorne und P.Kemp: The analysis of tissue phospholipids. Hydrolysis procedure and results with pig liver. J. Lipid Res. 1 (1960), 433;

113. Hüttig, C.: Statistische Untersuchungen an Bakterien aus der Fluorescensgruppe. Milchwirtsch. Forsch. 8 (1929), 513;

114. Huss, H.: Eine fettspaltende Bakterie (Bacteridium lipolyticum n. sp.) Cbl. Bact. II 20 (1908), 474;

115. Jackson, H.W.: Flavour research on cheese. Perfumery Essent. Oil Record 49 (1958), 256;

116. Jacobsberg, B.: Die Papierchromatographie in der Fettindustrie. Rev. Fermentat. Ind. aliment. 7 (1952), 142, Ref. in: Fette-Seifen-Anstrichmittel 59 (1957), 120;

117. Jáky, M.: Papierchromatographische Untersuchungen von Fettsäuren.
Fette-Seifen-Anstrichmittel 57 (1955), 721;

118. Jáky, M.: Beiträge zur Kenntnis papierchromatographischer Untersuchungen auf dem Fettgebiet.
Fette-Seifen-Anstrichmittel 61 (1959), 6;

119. James, A.T.: Trennung und Identifizierung gesättigter und ungesättigter Fettsäuren von der Ameisen- bis zur Dodecansäure mit Hilfe der Gaschromatographie.
Fette-Seifen-Anstrichmittel 59 (1957), 73;

120. James, A.T.: The separation of the long chain fatty acids by gas-liquid chromatography. Presented at 6th Ann. Symposium on Chemistry, Biochemistry and Metabolism of Lipids,
Ref. in Am. J. Clinical Nutrition 6 (1958), 595;

121. James, A.T.: Qualitative and quantitative determination of the fatty acids by gas-liquid chromatography.
Methods Biochem. Anal. 8 (1960), 1;

122. James, A.T.: Application of gas chromatography to some medical problems.
Chem. a. Ind. 1961, 1098;

123. James, A.T., und A.J.P. Martin: Retention volumes of methyl esters of saturated fatty acids from formic to n-caproic relative to methyl n-butyrate in a variety of stationary phases at two temperatures.
Biochem. J. 63 (1956), 144;

124. James, A.T., G. Peeters und M. Lauryssens: The metabolism of propionic acid.
Biochem. J. 64 (1956), 726;

125. James, A.T., und J. Webb: Determination of the structure of unsaturated fatty acids on a microscale with the gas-liquid chromatogram. Biochem. J. 66 (1957), 515;

126. James, A.T., J. Webb und T.D. Kellock: The fatty acids of human faecal lipids. Biochem. J. Proc. Biochem. Soc. 74 (1960) Nr. 2, 21; Ref. in: Gas Chromatog. Abstr. 1960, 209;

127. Jart, A.: Die gas-chromatographische Trennung von Fettsäureestern. Fette-Seife-Anstrichmittel 61 (1959), 541;

128. Jensen, L.B., und D.P. Grettie: The action of microorganisms on fats. Oil and Soap 10 (1933), 23;

129. Jensen, L.B., und D.P. Grettie: Action of microorganisms on fats. Food Res. 2 (1937), 97;

130. Jensen, R.G.: Spontaneous lipolysis in milk throughout the stages of lactation of individual cows. J. Dairy Sci. 42 (1959), 1619;

131. Jezeski, J.J., H.O. Halvorson und H. Macy The action of microorganisms on fats. J. Bact. 59 (1950), 645;

132. Johnston, P.V. und F.A. Kummerow: Gas liquid chromatography of methyl esters of fatty acids from human and chicken brain lipids. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 104 (1960), 201, Ref. in: Chem. Abstr. 54 (1960), 17493;

133. Jones, A., und T. Richards: Nightblue and Victoriablue as indicators in lipolytic media. Proc. Soc. Appl. Biol. 15 (1952), 82;

134. Jones, E.P., L.H. Mason, H.J. Dutton und R.F. Nystrom: Labelling fatty acids by exposure to tritium gas. II. Methyl oleate and linoleate. J. Org. Chem. 25 (1960), 1413;

135. Jovtscheff, A., A. Popoff, J. Micev und S. Spassov: Papierchromatographische Trennung kritischer Paare von Fettsäuren durch Brom-Methoxylierung. Fette-Seifen-Anstrichmittel 65 (1963), 913;

136. Kaiser, R.: Chromatographie in der Gasphase (I., II., III. Teil), Mannheim 1960, 1961, 1962;

137. Kapitel, W.: Die säulenchromatographische Trennung von Fettsäuren für analytische Zwecke. Fette-Seifen-Anstrichmittel 58 (1956), 91;

138. Karrer, P.: Lehrbuch der organischen Chemie, 13. Aufl., Stuttgart 1959;

139. Kaufmann, C., und E. Lehmann: Sind die in der histologischen Technik gebräuchlichen Fettdifferenzierungsverfahren spezifisch? Virchow's Arch. Path. Anat. u. klin. Med. 261 (1926), 623;

140. Kauffman, F.L., und G.D. Lee: A study of octadecanoic acids by gas-liquid partition chromatography and infra-red spectrophotometry. J. Am. Oil Chemists' Soc. 37 (1960), 385;

141. Kauffman, F.L., T.J. Weiss, G.D. Lee und B.N. Rockwood: Gas-liquid partition chromatography and ultra-violet absorption of oils before and after hydrogenation. J. Am. Oil Chemists' Soc. 38 (1961), 495;

142. Kauffman, F.L., J.W. Harlan, G.D. Lee M.D. Wilding und R.D. Beckstrom: Gas chromatography for meat flavor research. Proceedings of the twelfth research conference, American Meet Institute Foundation, Chicago 1960

143. Kaufmann, H.P.: Adsorptionstrennungen auf dem Fettgebiet. VI. Papierchromatographie. Fette-Seifen-Anstrichmittel 52 (1950), 331;

144. Kaufmann, H.P.: Analyse der Fette und Fettprodukte, Bd. I und II, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1958;

145. Kaufmann, H.P., und Z. Makus: Die Dünnschicht-Chromatographie auf dem Fettgebiet. I. Trennung von Modellmischungen. Fette-Seifen-Anstrichmittel 62 (1960), 1014;

146. Kaufmann, H.P., und Z. Makus: Die Papier-Chromatographie auf dem Fettgebiet. XLIV. Mitt. Die pc-Analyse der Glyceride. Fette-Seifen-Anstrichmittel 63 (1961), 125;

147. Kaufmann, H.P., Z. Makus und T.H. Khoe: Die Dünnschicht-Chromatographie auf dem Fettgebiet. III. Über die Sichtbarmachung der zu analysierenden Stoffe auf der Platte. Fette-Seifen-Anstrichmittel 63 (1961), 689;

148. Kaufmann, H.P., und G. Mankel: Anwendung der Gas-Chromatographie auf dem Fettgebiet. III. Einfluß der Herstellungsverfahren der Fettsäure-methylester auf das quantitative Ergebnis. Fette-Seifen-Anstrichmittel 65 (1963), 179;

149. Kaufmann, H.P., und W.H. Nitsch: Die Papier-Chromatographie auf dem Fettgebiet. XVI. Weitere Versuche zur Trennung von Fettsäuren. Fette-Seifen-Anstrichmittel 56 (1954), 154;

150. Kaufmann, H.P., A. Seher und G. Mankel: Anwendung der Gas-Chromatographie auf dem Fettgebiet. II. Quantitative Auswertung. Fette-Seifen-Anstrichmittel 64 (1962), 501;

151. Kaufmann, H.P., und C.V. Viswanathan: Die Dünnschicht-Chromatographie auf dem Fettgebiet. XIII. Methyl- und Äthylester höherer Fettsäuren in Körperlipoiden. Fette-Seifen-Anstrichmittel 65 (1963), 925;

152. Kaufmann, H.P., und H. Wessels: Die Dünnschicht-Chromatographie auf dem Fettgebiet. XIV. Die Trennung der Triglyceride durch Kombination der Adsorptions- und der Umkehrphasen-Chromatographie. Fette-Seifen-Anstrichmittel 66 (1964), 81;

153. Kaufmann, H.P. H. Wessels und C.V. Viswanathan: Die Papier-Chromatographie auf dem Fettgebiet. LI. Mitt. Präparative Trennung von Triglyceriden mit Hilfe der Papier-Chromatographie. Fette-Seifen-Anstrichmittel 64 (1962), 509;

154. Kaufmann, H.P., und Su Ko Young: Die Papier-Chromatographie auf dem Fettgebiet. L. Mitt. Die qualitative und quantitative Bestimmung von Hydroxy- und Ketofettsäuren. Fette-Seifen-Anstrichmittel 64 (1962), 434;

155. Kaufmann, W.: Beitrag zum fermentativen Eiweiß- und Fettabbau. Zbl. Bakt. I. Orig. 160 (1953), 238;

156. Kendall, A.J., A.A. Day und A.W. Walker: Studies in bacterial metabolism. XXXVIII. Observations on fat splitting in milk by bacterial lipase. J. Am. Chem. Soc. 36 (1914), 1962;

157. Keulemans, A.I.M.: Gaschromatographie, übersetzt und bearbeitet von E. Cremer, Weinheim 1959;

158. Kirsh, D.: Factors influencing the activity of fungus lipase. J. Biol. Chem. 108 (1935), 421;

159. Kirsh, D.: Lipase production of penicillium oxalicum and aspergillus flavus. Bot. Gazette 97 (1935), 321 Ref. in: Zbl. Bakt. II 95 (1936/37), 487;

160. Kishimoto, Y., und N.S. Radin: Isolation and determination methods for brain cerebrosides, hydroxy fatty acids and unsaturated and saturated fatty acids. J. Lipid Res. 1 (1959), 72;

161. Klinge, K.: Der Nachweis der mikrobiellen Fettspaltung mit Nilblausulfat. Arch. Hyg. 140 (1956), 492;

162. Klouven, M.H., R. ter Heide und J.G. Kok: Dünnschicht-Chromatographie. II. Trennung aromatischer Aldehyde. Fette-Seifen-Anstrichmittel 65 (1963), 414;

163. Kmety, E., und P. Bakoss: Haemolyse- u. Lipaseproduktion bei Leptospiren verschiedener Serotypen. Zbl. Bakt. I. Orig. 181 (1961), 503;

164. Kohnle, K.: Untersuchungen über aromabildende und halophile Bakterien in der Rohwurst. Diss. vet. med., Gießen 1953;

165. Krösche, H.: persönl. Mitteilung;

166. Krukovsky, V.N., und P.F. Sharp: Effect of lipolysis on the churnability of cream obtained from the milk of cows in advanced lactation. J. Dairy Sci. 19 (1936), 279;

167. de Kruyff, E.: zit. n. 129;

168. Kushner, D.J.: The effect of alcohols on the synthesis of lipase lecithinase and other enzymes by bacillus cereus. Biochem. J. 75 (1960), 386;

169. Lada, A.: Die Reinigung des Unverseifbaren durch Kohlesäulen-Chromatographie. J. Assoc. Offic. Agr. Chemists 37 (1954), 550, Ref. in: Fette-Seifen-Anstrichmittel 59 (1957), 57;

170. Landowne, R.A., und S.R. Lipsky: Simple method for distinguishing between unsaturated and branched fatty acid isomers by gas chromatography. Biochim. Biophys. Acta 47 (1961), 589;

171. Lane, C.B., und B.W. Hammer: Bacteriology of cheese. VI. Relationship of fat hydrolysis to the ripening of Cheddar cheese. Iowa Agric. Exp. Station, Ames. Iowa Agric. Exp. Sta. Res. Bull. 291 (1941), 352, Ref. in: Milchwiss. 4 (1949), 60;

172. Laxa, O.: Über die Spaltung von Butterfett durch Mikroorganismen. Arch. Hyg. 41 (1901), 119

173. Lefort, D., C. Paquot und A. Pourchez: Gas-Chromatographie und Fettchemie. Vergleich der Methyl-, Propyl- und Isopropylester von Fettsäuren mit Hilfe der Gas-Chromatographie. Oléagineux 17 (1962), 629, Ref. in: Fette-Seifen-Anstrichmittel 65 (1963), 256;

174. Lehmann, K.B., und P. Uhlenhuth: Die Zersetzung der Fette durch Bakterien. Arch. Hyg. 100 (1928), 271;

174a. Lembke, A., L. Beuermann und W. Kaufmann: Zur Kinetik der Bakterienlipase. Zbl. Bakt. I. Orig. 160 (1954), 423;

175. Lembke, A., und B. Hahn: Über die Wirkung von Stoffwechselprodukten des Penicillium claviforme auf Zellen und Gewebe unterschiedlicher Entwicklungshöhe. Kieler Milchw. Forsch. 6 (1954), 219;

176. Lembke, A., und W. Kaufmann: Die Ultra-Spektroskopie an Fetten. Absorptionsspektren von freien und methylierten Fettsäuren. Kieler Milchwirtsch. Forsch. 7 (1955), 1;

177. Lerche, M., und H. Lammers Die Hefen der Rohwurst. Arch. Lebensm. Hyg. 6 (1955), 93;

178. Link, W.E.: General methods of analysis of drying oils. J. Am. Oil Chemists' Soc. 36 (1959), 477;

179. Lipsky, S.R., R.A. Landowne und M.R. Godet: Effects of varying the chemical composition of the stationary liquid on the resolution of the long-chain satured and unsatured fatty acid esters by gas-liquid chromatography. Biochim. Biophys. Acta 31 (1959), 336;

180. Liskens, H.F., und L. Stange: Praktikum der Papierchromatographie, Berlin-Göttingen - Heidelberg 1961;

181. Loewenstein, L., W.L. Fleming und J.M. Neill: Studies on bacterial enzymes. VII. Lactase and lipase of the colon bacillus. J. expt. Med. 49 (1929), 475;

182. Long, H.F., und B.W. Hammer Methods for the detection of lipolysis by microorganisms. Iowa State Coll. J. Sci. 11 (1936/37), 343;

183. Lowrekowich, L.: Simple methods for testing the nitrate reducing, catalase and fat splitting activity of bacteria. Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung. 4 (1957), 363, Ref. in: Zbl. Bakt. I. Ref. 168 (1958), 502;

184. Lundberg, W.O.: Mechanisms. in: Schultz, H.W., E.A. Day, R.O., Sinnhuber, Symposium on Foods: Lipids and their Oxidation, Westport, Connecticut 1962;

185. MacFarlane, M.G., G.M. Gray, und L.W. Weeldon: Fatty acids of phospholipids from mitochondria and microsomes of rat liver. Biochem. J. Proc. Biochem. Soc. 74 (1960), Nr. 3, 43
Ref. in: Gas Chromatog. Abstr. 1960, 210;

186. Macy: zit. n. 54;

187. Macy und Gibson: Study of Oospora lactis.
J. Dairy Sci. 20 (1937), 447;

188. Magidman, P., S.F. Herb, R.A. Barford und R.W. Riemenschneider: Fatty acids of cows' milk.
A. Techniques employed in supplementing gas-liquid chromatography for identification of fatty acids.
J. Am. Oil Chemists' Soc. 39 (1962), 137;

189. Máky, M.: Beiträge zur Kenntnis papierchromatographischer Untersuchungen auf dem Fettgebiet.
Fette-Seifen-Anstrichmittel 61 (1959), 6;

190. Malin, L.: Determination of fatty acid composition by gas chromatography and ultra-violett spectrophotometry.
Lab. Practice 8 (1959), 226
Ref. in: Gas Chromatog. Abstr. 1959, 534;

191. v.Mallinckrodt-Haupt, A.: Der Fettstoffwechsel der Hautpilze. I. Mitt. Das Fettspaltungsvermögen der lebenden Pilzkultur.
Zbl. Bakt. I. Orig. 103 (1927), 73;

192. Malins, D.C., und H.K. Mangold: Analysis of complex lipid mixtures by thin layer chromatography and complementary methods
J. Am. Oil Chemists' Soc. 37 (1960), 576;

193. de Man, J.M.: Die Gas-Chromatographie der kurzkettigen Fettsäuren v. Milchfetten. Fette-Seifen-Anstrichmittel 64 (1962), 475;

194. Mangold, H.K., und R. Kammereck: Separation, identification and quantitative analysis of fatty acids by thin layer chromatography and gas-liquid chromatography. Chem. a. Ind. 1961, 1032;

195. Manus, L.J., und L.M. Thurston: Study of the cause of bitter flavor in cream. J. Dairy Sci. 19 (1936), 484;

196. Matlack, M.B., und I.W. Tucker: An esterase of muscular tissue. J. Biol. Chem. 132 (1940), 663;

197. McGrath, J.T., und J.A. Anderson Lipolytic activities of several bacteria causing bitter cream. J. Bact. 27 (1934), 68;

198. McGreer, D.E.: Pyrazolines J. Org. Chem. 25 (1960), 852;

199. McInnes, A.G.: Practical notes on gas-liquid chromatography as applied to the estimation of volatile fatty acids. I.P. Symposium, London, 1956, Ed. Destey, D.H., London 1957, S. 304, Ref. in: Gas Chromatog. Abstr. 1958, 916;

200. McInnes, A.G., R.P. Hansen und A.S. Jessop: The volatile acids of mutton fat. Biochem. J. 63 (1956), 702;

201. McInnes, A.G., N.H. Tattrie und M. Kates: Application of gas-liquid partition chromatography to the quantitative estimation of monoglycerides. J. Am. Oil Chemists' Soc. 37 (1960), 7;

202. Merrit, C., S.R. Bresnick, M.L. Bazinet, J.T. Walsh und P. Angelini: Determination of volatile components of foods. Techniques and their applications to studies of irradiated beef. J. Agr. Food Chem. 7 (1959), 784

203. Metcalfe, L.D.: Gas chromatography of unesterified fatty acids using polyester columns treated with phosphoric acid. Nature 188 (1960), 142;

204. Metcalfe, L.D. und A.A. Schmitz: The rapid preparation of fatty acid esters for gas chromatographic analysis. Anal. Chem. 33 (1961), 363;

205. Michaelis, L. und Y. Nakahara: Die Fettspaltungsfermente der Bakterien. Z. f. Immunitätsforsch. 36 (1923), 449;

206. Moir, G.M., und R.R. Russel: Bacteriological testing of butter. New and simplified routine methods. J. Dairy Res. 10 (1939), 310;

207. Montag, A.: Dünnschicht-chromatographischer Nachweis einiger fettlöslicher, synthetischer und natürlicher Farbstoffe in Lebensmitteln. Z. Lebensm.-Untersuch. u. -Forsch. 116 (1961), 413;

208. Morris, L.J., R.T. Holman und K. Fontell: Vicinally unsaturated hydroxy acids in seed oils. J. Am. Oil Chemists' Soc. 37 (1960), 323;

209. Mukherjee, S.: Studies on degradation of fats by microorganisms. I. Preliminary investigations on enzyme systems involved in the spoilage of fat. Arch. Biochem. Biophys. 33 (1951), 364;

210. Munch-Petersen, J.: Reactions of unsaturated esters. IX. Acta Chem. Scand. 15 (1961), 277;

211. Mundinger, E.: Über die chemischen und bakteriologischen Vorgänge beim Verderben des Butterfetts. Milchwirtsch. Forsch. (Orig.) 7 (1929), 292;

212. Nair, J.H.: Lipase in raw, heated, and desiccated milk. Ind. Chem. 22 (1960), 42;

213. Nashif, S.A., und F.E. Nelson: The lipase of Pseudomonas fragi. I. Characterisation of the enzyme. J. Dairy Sci. 36 (1953), 459;

214. Nashif, S.A., und F.E. Nelson: The lipase of Pseudomonas fragi. II. Factors affecting lipase production. J. Dairy Sci. 36 (1953), 471;

215. Nashif, S.A. und F.E. Nelson: The lipase of Pseudomonas fragi. III. Enzyme action in cream and butter. J. Dairy Sci. 36 (1953), 481;

216. Nashif, S.A., und F.E. Nelson: The extracellular lipases of some gram-negative non-sporeforming rod-shaped bacteria. J. Dairy Sci. 36 (1953), 698;

217. Nelson, G.J.: Studies on human serum lipoprotein phospholipids and phospholipid fatty acid composition by silicic acid chromatography. J. Lipid Res. 3 (1962), 71;

218. Nelson, W.O.: Some characteristics of the lipase of Geotrichum candidum. J. Dairy Sci. 35 (1952), 455;

219. Nelson, W.O.: Nutritional factors influencing growth and lipase production by Geotrichum candidum. J. Dairy Sci. 36 (1953), 143;

220. Neuberg, C., und K. Reicher: Lipolyse, Agglutination und Hämolyse. Münch. med. Wschr. 1907, 1725;

221. Niesar, K.H.: Futterfette und Fettsäurestoffwechsel als qualitätsbeeinflussende Faktoren tierischer Lebensmittel. Landwirtsch. Forsch., 18. Sonderheft 1964;

222. Niesar, K.H.: Untersuchungen zum Einfluß von Futterfetten auf das Fettsäuremuster der Organlipide landwirtschaftlicher Nutztiere. (Habilitationsschrift, Veröffentlichung in Vorbereitung);

223. Niinivaara, F.P. und M.S. Pohja: Über die Reifung der Rohwurst. II. Z. Lebensmitt.- Untersuch. u. -Forsch. 106 (1957), 187;

224. Niinivaara, F.P., M.S. Pohja und S.E. Komulainen: Some aspects about using bacterial pure cultures in the manufacture of fermented sausages. Food Technol. 18 (1964) Nr. 2, 25;

225. Noda, M., und O. Hirayama: Die Rundfilter-Chromatographie als einfache analytische Methode für Fettsäuren und Glyceride. Yukagaku 10 (1961), 24, Ref. in: Fette-Seifen-Anstrichmittel 65 (1963), 676;

226. Norman, A.: Separation of conjugated bile acids by partition chromatography. Bile acids and steroids. 6. Acta Chem. Scand. 7 (1953), 1413;

227. Novotny, A., O. Lüderitz und O. Westphal: Rundfilterchromatographie langkettiger Fettsäuren. Biochem. Z. 330 (1958), 47;

228. Ohta, K.: Über die fettzehrenden Wirkungen der Schimmelpilze nebst dem Verhalten des Organfettes gegen Fäulnis. Biochem. Z. 31 (1911), 177;

229. Orla-Jensen, S.: Studien über das Ranzigwerden der Butter. Cbl. Bact. II., 8 (1902), 11;

230. Palitzsch, A.: Untersuchungen zur Umaromatisierung des Schweinefleisches. Diss. med. vet., München 1965

231. Palmers, L.S.: Is lipase a normal constituent of cow's milk? Sect. of dairy chem., div. of agricult., biochem., Univ. Minnesota, St. Paul, Minnesota, Ref. in: Milchwiss. Forsch. 6 (1928), 47;

232. Pernice, A.: Sull' azione lipolitica dello stafilococco. I. Attività aliesterasica e lipasica. G. Microbiol. 9 (1961), 170, Ref. in: Zbl. Bakt. I. Ref. 186 (1962), 429;

233. Pernice, A., und N. Macri: Sull' azione lipolitica dello stafilococco. III. Influence delle formalina. G. Batt., Virol. ed Immun. ed Ann. Osped. Maria Vitoria di Torino, 55 (1962), 23;

234. Peters, I.I., und F.E. Nelson The influence of mycotorula lipolytica lipase upon the ripening of blue cheese made from pasteurized homogenized milk. J. Dairy Sci. 31 (1948), 611;

235. Peters, I.I., und F.E. Nelson: Factors influencing the production of lipase by mycotorula lipolytica. J. Bact. 55 (1948), 581;

236. Peters, I.I., und F.E. Nelson Vitamin requirements for lipase production by candida lipolytica. J. Bact. 61 (1951), 591;

237. Peterson, M.H., und M.J. Johnson: Delayed hydrolysis of butterfat by certain lactobacilli and micrococci isolated from cheese. J. Bact. 58 (1949), 701;

238. Peterson, M.H., M.J. Johnson und W.V. Price: Determination of cheese lipase. J. Dairy Sci. 31 (1948), 31;

239. Peterson, M.H., M.J. Johnson und W.V. Price: Lipase activity during making and ripening of cheddar cheese. J. Dairy Sci. 31 (1948), 39;

240. Petruccioli, G.: Der papierchromatographische Nachweis von Traubenkernöl in Olivenöl. Olii minerali, Grassi Saponi, Colori Vernici 36 (1959), 260; Ref. in: Fette-Seifen-Anstrichmittel 63 (1961), 661;

241. Phillips, C.: Gas Chromatography, New-York 1956;

242. Pigulewski, G., und M. Charik: Zersetzung des Olivenöls unter dem Einfluß der vitalen Tätigkeit einiger Mikroorganismen; Umwandlung von Oleinsäure in Ketostearinsäure. Biochem. Z. 200 (1928), 201;

243. Plotkina, A.: Der Einfluß der Zusammensetzung des Milieus auf die Lipasebildung durch B. pyocyaneus und Oidium lactis. Izv. naucn. Inst. Lesgafta 15 (1929), 183, Ref. in: Milchwiss. Forsch. 11 (1931), 14;

244. Podbielniak, W.J., S.T. Preston und P.J. Turkal: Analysis of fatty acids and their esters by vapour-phase chromatography. Presented at 30th fat meeting of Am. Oil Chemists' Soc., Chicago, September 156, Ref. in: Anal. Chem. 28 (1956), 2027;

245. Pohja, M.S.: Micrococci in fermented meat products. Acta Agralia Fennica 1960, 96;

246. Powe, W.C., und W.L. Marple: The fatty acid composition of clothes soil. J. Am. Oil Chemists' Soc. 37 (1960), 136;

247. Purr, A.: Über die Fremdfettbestimmung in Kakaoerzeugnissen. IX. Säulenchromatographischer Nachweis geringer Zusätze eines "Englischen Kakaobutter-Ersatzfettes EKE" auf Palmölbasis in der aus Kakaobutter bei -25°C gewonnenen acetonlöslichen Glyceridfraktion. Fette-Seifen-Anstrichmittel 61 (1959), 119;

248. Rahn, O.: Die Zersetzung der Fette. Zbl. Bakt. II. 15 (1906), 53;

249. Rahn, O., und W. Mohr: Der Luftgehalt der Butter. Milchwirtsch. Forsch. Orig. 1 (1924), 213;

250. Rath, S.: Ein Versuch zur Verbesserung der Methodik zur quantitativen Ermittlung lipolytischer Keime. Milchwissenschaftliche Berichte 11 (1961), 97;

251. Recourt, J.H., und R.K. Beerthuis Der Nachweis von tierischen Fetten in pflanzlichen Ölen und Fetten mit Hilfe der Gas-Chromatographie. Fette-Seifen-Anstrichmittel 65 (1963), 619;

252. Rettie, T.: A new method of applying nile blue as a fat stain. J. Path. and Bact. 34 (1931), 595;

253. Rice, F.E., und A.L. Markley: Proof of the presence of lipase in milk and a new method for the detection of the enzyme. J. Dairy Sci. 5 (1922), 64;

254. Richter und Damm: zit. n. 54;

255. Ringby, F.L., E. Sihto und A. Bars: Additional constituents of hops. J. Inst. Brewing 68 (1962), 60;

256. Ritzerfeld, W., und L. Schulz: Untersuchungen an Bakterienstämmen aus einem Modellrieselfeld unter besonderer Berücksichtigung der fettspaltenden Keime. Arch. Hyg. 141 (1957), 297;

257. Rolle, M.: Mikrobiologie und allgemeine Seuchenlehre, Stuttgart 1958, S. 141;

258. Romeis, B.: Mikroskopische Technik, München 1948;

259. Rouser, G., A.J. Baumann, N. Nicolaides und D. Heller: Paper chromatography of lipids: Methods, applications, and interpretations. J. Am. Oil Chemists' Soc. 38 (1961), 565;

260. Rybicka, S.M.: The quantitative analysis of drying oil fatty acids by gas-liquid chromatography. Chem. a. Ind. 1960, 1594;

261. Sambasivarao, K., und J.B. Brown: The nature of the C_{18} polyethenoic fatty acids of butterfat. J. Am. Oil Chemists' Soc. 39 (1962), 340;

262. Sandermann, W., und G. Weissmann: Gas-chromatographische Untersuchungen der Fettsäuren des Tallöls. Fette-Seifen-Anstrichmittel 62 (1960), 1011;

263. Savidan, L.: Chromatographie aliphatischer Verbindungen mit höherem Molekulargewicht. Oléagineux 13 (1958), 207, Ref. in: Fette-Seifen-Anstrichmittel 61 (1959), 1269;

264. Sayer, W.S., O. Rahn und B. Farrand — zit. n. 129;

265. Schels, H., und F. Hadzihalilović: — Zur Bedeutung von Streptokokken und Laktobazillen bei der Rohwurstreifung, Vortrag, gehalten auf der 8. Tagung der Arbeitsgemeinschaft "Lebensmittelhygiene" der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft vom 14. - 16. Oktober 1964 in Malente-Gremsmühlen (nicht veröffentl.);

266. Schenker, R.: — Zur Kenntnis der Lipase von Aspergillus niger (van Tiegh). Biochem. Z. 120 (1921), 164;

267. Schnell: — Oospora lactis-Variationen. Zbl. Bakt. II. 35 (1912) 1;

268. Scholfield, C.R., E.P. Jones, J. Nowakowska, E. Selke und H.J. Dutton: — Hydrogenation of linolenate. II. J. Am. Oil Chemists' Soc. 38 (1961), 208;

269. Scholfield, C.R., E.P. Jones, J. Nowakowska, E. Selke, B. Sreenivasan und H.J. Dutton: — Hydrogenation of linolenate. I. Fractionation and characterisation studies. J. Am. Oil Chemists' Soc. 37 (1960), 579;

270. Schormüller, J. und H. Langner: — Analysengang zur quantitativen Bestimmung organischer Säuren in Lebensmitteln. Z. Lebensm.-Untersuch. u. -Forsch. 113 (1960), 104;

271. Schreiber, K.: — Fettzersetzung durch Mikroorganismen. Arch. Hyg. 41 (1902), 328;

272. Sedlácek, B.A.J.: Untersuchungen über das Ranzigwerden von Fetten mit Hilfe UV-spektrophotometrischer und anderer Methoden.
Nahrung 8 (1964), 176;

273. Sedych, A.: Beitrag zum Verhalten gewöhnlicher, verbreiteter Mikroorganismen gegenüber Fetten.
Bull. of the State Inst. of Agric. Microbiol. USSR, T.5. 1933, 299
Ref. in: Zbl. Bakt. II 92 (1935), 207;

274. Seher, A.: Der analytische Nachweis synthetischer Antioxydantien in Speisefetten. II. Trennung und Identifizierung synthetischer Antioxydantien durch Dünnschicht-Chromatographie.
Fette-Seifen-Anstrichmittel, 61 (1959), 345;

275. Seher, A.: Weitere Ergebnisse der Dünnschicht- Chromatographie der Antioxydantien.
Fette-Seifen-Anstrichmittel 61 (1959), 1104;

276. Seliber, G.L., und L.W. Dobrowolskaja: Über verlängerte Aufbewahrung fettauflösender Bakterien.
Mikrobiologija SU 30 (1961), 54,
Ref. in: Zbl. Bakt. I. Ref. 182 (1961), 382;

277. Sjövall, J.: On the separation of bile acids by partition chromatography. Bile acids and steroids.4.
Acta Physiol. Scand. 29 (1953), 232;

278. Smirnov, B.P. R.A. Popova und R.A. Niskanen: Die quantitative Papier-Chromatographie höherer Fettsäuren in Form ihrer Methylester ($RCOO^{14}CH_3$).
Biochimia (russ.) 25 (1960), 368,
Ref. in: Fette-Seifen-Anstrichmittel 65 (1963), 74;

279. Smith, J.L.: On the simultaneous staining of neutral fats and fatty acids by oxazine dyes. J. Path. Bact. 12 (1908), 1;

280. Smith, J.L.: zit. n. 46;

281. Söhngen, N.L.: Fettspaltung durch Bakterien. Koningl. Acad. Wet., Amsterdam 19 (1910), 667;

282. Söhngen, N.L.: Wärmebeständige Lipase. Koningl. Acad. Wet., Amsterdam 20 (1911), 126;

283. Sommaruga, E.: Über den Stoffwechsel von Mikroorganismen. III. Mitt. Z. Hyg. u. Infektionskrankh. 18 (1894), 441;

284. Spannhof, L.: Einführung in die Praxis der Histochemie. Jena, 1964;

285. Spiekermann, A.: Die Zersetzung der Fette durch höhere Pilze. I. Der Abbau des Glycerins und die Aufnahme der Fette in die Pilzzelle. Z. Untersuch. Nahrungs- u. Genußmittel 23 (1912), 305;

286. Spiekermann, A., und W. Bremer: Untersuchungen über die Veränderungen von Futter- und Nahrungsmitteln durch Mikroorganismen. I. Untersuchungen über die Veränderungen fettreicher Futtermittel beim Schimmeln. Landw. Jahrbuch 31 (1902), 81;

287. Spitzer, G., und E.H. Parfitt: Study of the lipolytic enzymes of three specific organisms. J. Bact. 29 (1935), 69;

288. Stadhouders, J.J.: De hydrolyse van vet bij de kaasrijping in verband met de smaak van kaas. Landbouwhogeschool, Wageningen 1956, Ref. in: Milchwiss. 13 (1958), 143;

289. Stadhouders, J.J. und H. Mulder: Some observations on milk lipase. I. The estimation of milk lipase activity. Neth. Milk Dairy J. 12 (1958), 117, Ref. in: Milchwiss. 15 (1960), 364;

290. Stahl, E.: Dünnschicht-Chromatographie, eine adsorptionschromatographische Schnellmethode mit besonderer Berücksichtigung der Untersuchung von Lipiden. Fette-Seifen-Anstrichmittel 60 (1958), 1027;

291. Stahl, E.: Dünnschicht-Chromatographie, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1962;

292. Stark, C.N., und B.J. Scheib: The correlation between the spoilage of butter and the presence of fat splitting and casein digesting bacteria. J. Bact. 31 (1936), 87;

293. Starr, M.P.: Spiritblue agar: A medium for the detection of lipolytic organisms. Science 93 (1941), 333;

294. Stearns, E.M., H.B. White und F.W. Quackenbush: Use of mercuric acetate addition to prepare unsaturated fatty esters concentrates, J. Am. Oil Chemists' Soc. 39 (1962), 61;

295. Stevens, F.A., Franklin und R. West: The peptidase, lipase, and invertase of hemolytic streptococcus. J. Exp. Med. 35 (1922), 823;

296. Stevens, R.: Gas chromatographic retention data using glycerol as stationary phase with reference to formaldehyde.
Anal. Chem. 33 (1961), 1126;

297. Stockoe, W.N.: The rancidity of coconut oil produced by mold action.
Biochem. J. 22 (1928), 80;

298. Storck, W.: Beitrag zur Kenntnis der Alkalibildner in Rohmilch.
Zbl. Bakt. II 94 (1936), 295

299. Swoboda, P.A.T.: Quantitative and qualitative analysis of flavour volatiles from edible fats.
Gas Chromatography 1962, Hamburg Symposium, June 1962, London 1963, S. 273,
Ref. in: Gas Chromatog. Abstr. 1963, 951;

300. Täufel, K., H. Thaler und M. Löweneck: Über den Abbau von Fettsäuren durch Schimmelpilze.
Fettchemische Umschau 43 (1936), 1;

301. Tammisto, E.S.: Untersuchungen über die Lipasen der Bakterien.
Ann. Acad. Sci. Fenn., A, 38 (5), Helsinki 1933;

302. Tammisto, E.S.: Untersuchungen über die Lipase der Bakterien.
Diss., Helsinki 1933,
Ref. in: Milchwiss. Forsch. 16 (1934), 24;

303. Terplan, G.: Zur Differenzierung von euterpathogenen Micrococcaceae.
Vortrag, gehalten auf der 8. Tagung der Arbeitsgemeinschaft "Lebensmittelhygiene" der deutschen veterinärmedizinischen Gesellschaft in Malente-Gremsmühlen vom 14. bis 16. Oktober 1964. (Veröffentlichung in Vorbereitung);

304. Terplan, G.: Biologische, chemische und physikalische Vorgänge bei der Herstellung von gepökelten und gereiften Fleischwaren (Habilitationsschrift, Veröff. in Vorbereitung);

305. Thaler und Geist zit. n. 54;

306. Thaung, U.K., A. Gros und R.O. Feuge: Characterisation of oils from low-gland and glandless cottonseed. J. Am. Oil Chemists' Soc. 38 (1961), 220;

307. Thiele, O.W., und W. Wober: Zur papierchromatographischen Trennung von Phosphatiden auf einem neuartigen Kieselgelpapier. Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 326 (1961), 89;

308. Thompson, M.P. J.R. Brunner und C.M. Stine: Characteristics of high melting triglyceride fractions from the fat globule membrane and butter oil of bovine milk. J. Dairy Sci. 42 (1959), 1651;

309. Thorpe, J.F.: A reaction of certain coloring matters of the oxazine series. J. Chem. Soc. 91 (1907), 324

310. Timmen, H.: Gaschromatographischer Butter-Margarine-Vergleich als Hilfsmittel zur Klärung von Buttereiproblemen. Kieler Milchwirtsch. Forschungsberichte 15 (1963), 391;

311. Turner, R.H.: A differential plating medium for lipase-producing bacteria. Soc. Exptl. Biol. and Med. Proc. 25 (1927/28), 318;

312. Turner, R.H.: The action of bacteria on fat. 1. Relative merits of various differential plating mediums for lipase producing organisms. J. Infect. Dis. 44 (1929), 126;

313. Ueno, Y.: Eine Methode zur Mikrobestimmung niederer aliphatischer Fettsäuren durch Papier-Chromatographie und ihre Anwendung zur Untersuchung des Stoffwechsels von Ascaris lumbricoides var. suis. J. Biochem. (Tokyo) 48 (1960), 161, Ref. in: Fette-Seifen-Anstrichmittel 65 (1963), 167;

313a. Vastesaeger, M.M. und R. Delcourt: Comparative pathology of artheriosclerosis. Vortrag, gehalten auf dem 1. Welt-Fett-Kongreß vom 12. - 18. Oktober 1964 in Hamburg (nicht veröffentl.)

314. Vickery, J.R.: Action of microorganisms on fat. I. Hydrolysis of beef fat by some bacteria and yeasts tolerating low temperatures. J. Council. Sci. Ind. Res. 9 (1936), 107;

315. Vioque, E., und R.T. Holman: Quantitative estimation of esters by thin-layer chromatography. J. Am. Oil Chemists' Soc. 39 (1962), 63;

316. Vitagliano, M., A.M. Leone und A. Vodret: Determining the purity of olive oil by gas chromatography. Olearia 14 (1960), 177, Ref. in: Chem. Abstr. 55 (1961), 8896;

316a. Vodovar, N.: Sur l'absorption des graisses chez le porc. Vortrag, gehalten auf dem 1. Welt-Fett-Kongreß vom 12. - 18. Oktober 1964 in Hamburg (nicht veröffentl.); Diskussionsbeitrag und persönl. Mitteilung;

317. Vorbeck, M.L., L.R. Mattick, F.A. Lee und C.S. Pederson: Determination of fatty acids of lower molecular weights by gas chromatography. Nature 187 (1960), 689;

318. Vorbeck, M.L., L.R. Mattick, F.A. Lee und C.S. Pederson: Preparation of methyl esters of fatty acids for gas-liquid chromatography. Anal. Chem. 33 (1961), 1512;

319. Voss, R.: Studien über Margarine, Diss. nat., Kiel 1925;

320. de Vries, B., und G. Jurriens: Trennung von Lipiden mittels Dünnschicht-Chromatographie auf mit Silbernitrat imprägniertem Kieselgel. Fette-Seifen-Anstrichmittel 65 (1963), 725;

321. Waksmann, S.A.: Principles of soil microbiology, Baltimore 1929, S. 464;

322. Waksmann, S.A. und W.C. Daviston: Enzymes, Baltimore 1929;

323. Van der Walle, N.: Über synthetische Wirkung bakterieller Lipasen. Cbl. Bact. II. 70 (1927), 369;

323a. Weiss, E.: persönl. Mitteilung;

324. Wegmann, R., P.F. Ceccaldi und J. Biez: Trennung von Fetten und Fettsäuren mittels Papier-Chromatographie Fette-Seifen-Anstrichmittel 56 (1954), 159.

325. Wellhäuser, R.: Untersuchungen über einige mikrobielle Vorgänge bei der Rohwurstherstellung. Beeinflussung von Muskelfarbstoff, Muskeleiweiß und Fett durch Rohwurstkeime. Diss. med. vet., München 1963;

326. Wells, H.G., und H.J. Corper: The lipase of tuberculosis and other bacteria. Studies on the biochemistry of chemotherapy of tuberculosis. III. J. Infect. Dis. 11 (1912), 388;

327. Westway, H., und J.F. Williams: Composition of the dipetene fraction $C_{10}H_{16}$ terpenes. J. Appl. Chem. 9 (1959), 440;

328. Wick, E.L., T. Yamanishi, L.C. Wertheimer, J.E. Hoff, B.E. Proctor und I.A. Goldblith: An investigation of some volatile components of irradiated beef. J. Agr. Food Chem. 9 (1961), 289;

329. Willis, A.T.: The lipolytic activity of some clostridia. J. Path. Bact. 80 (1960), 379;

330. Winsauer, K.: Zur papierchromatographischen Bestimmung von Oxystearinsäuren. Mikrochim. Acta 1957, 480, Ref. in: Fette-Seifen-Anstrichmittel 61 (1959), 67;

331. Wiss, O., und U. Gloor: Verteilungschromatographie mit umgekehrten Phasen für Vitamin A und weitere fettlösliche Vitamine. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 310 (1958), 260;

332. Wurzinger, J., und E. Lindemann: Über die Bedeutung der Säurezahl für die Beurteilung von Schweineschmalz. Fleischwirtschaft 10 (1958), 152;

333. Youngs, C.G.: Glyceride structure of fats. J. Am. Oil Chemists' Soc. 36 (1959), 664;

334. Zanzucchi, A., und G. Delindati: Sull' influenca delle flora batterica nei processi di maturazione degl' insaccati. Industria Conserve 32 (1957), 3;

335. Zöllner, N., und K. Kirsch: Die säulenchromatographische Trennung der Plasmalipoide. I. Methodik und Identifizierung der Fraktionen. Z. ges. exp. Med. 134 (1960), 10.

An dieser Stelle erlaube ich mir, Herrn Prof. Dr. L. Kotter für die freundliche Überlassung des Themas zu danken. - Mein Dank gilt allen Institutsangehörigen, die meine Arbeit gefördert haben, insbesondere Fräulein Diplom-Lebensmittelchemikerin Biruta Rolle, Herrn Univ.-Doz. Dr. G. Terplan und Herrn Dr. R. Wellhäuser. - Ferner bin ich Herrn Priv.-Doz. Dr. H. Endres (Badische Anilin- & Soda-Fabrik, Ludwigshafen/Rh., vormals Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung, München), Herrn Dr. G. Raupp (Bodenseewerk Perkin-Elmer, Ingenieurbüro Frankfurt/M) und Herrn Dipl.-Chem. H. Krösche (Institut für Organische Chemie der Technischen Hochschule Braunschweig) verpflichtet. - Nicht zuletzt möchte ich Frau Maria Ott für die oft selbstlose Hilfe bei der technischen Durchführung der Untersuchungen meinen Dank aussprechen.

Lebenslauf

Am 18. August 1938 wurde ich als Sohn des Oberstabsveterinärs Dr. Hans-Georg Schulze und seiner Ehefrau Luise, geb. Viehweger in Berlin geboren.

Nach dem Besuch der Volksschulen in Breitenrode, Krs. Gardelegen, und Ehmen, Krs. Gifhorn, sowie des Gymnasiums in Wolfsburg, wo ich 1958 die Reifeprüfung ablegte, studierte ich an der Ludwig-Maximilians-Universität München Tiermedizin, Rechts- und Wirtschaftswissenschaften (Stipendiat des Stifterverbandes für die Deutsche Wissenschaft).

1962 legte ich die erste juristische Staatsprüfung und 1963 die tierärztliche Prüfung ab.

Seit 1962 bin ich Rechtsreferendar (Oberlandesgerichtsbezirk München) und wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Nahrungsmittelkunde der Tierärztlichen Fakultät der Universität München. 1964 erhielt ich die Bestallung als Tierarzt.